

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Química (IQ)
Laboratório de Geoquímica Orgânica Molecular e Ambiental (LAGOA)

**Desenvolvimento e otimização de método *fast-GC*×GC-TOFMS
para análise de geoquímica orgânica ambiental**

Rafael Sales Xavier
DRE: 115066046

Orientadores
Profa. Dra. Débora de Almeida Azevedo
M.Sc. Vinícius Barreto Pereira

2022

RAFAEL SALES XAVIER

Desenvolvimento e otimização de método *fast-GC*×GC-TOFMS para análise de geoquímica orgânica ambiental

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de bacharel em Química com Atribuições Tecnológicas.

Orientadores:

Profa. Dra. Débora de Almeida Azevedo (DQO-IQ/UFRJ)

M.Sc. Vinícius Barreto Pereira (LADETEC-IQ/UFRJ)

Rio de Janeiro

2022

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Jacqueline e Célio e às minhas irmãs Victória e Rayssa e ao meu irmão Célio por sempre acreditar, dar suporte e pelas palavras de carinho em toda a minha trajetória.

Aos meus orientadores Prof^a Dr^a Débora de Almeida Azevedo e M.Sc. Vinícius Barreto Pereira, pela orientação, motivação, confiança, eventuais puxões de orelha e conselhos quando necessário.

Às minhas coorientadoras de iniciação científica Dra. Dayane Coutinho, Dra. Daniela França e Profa. Dra. Gabriela Vanini por todos os ensinamentos, correção de relatórios e pelas cobranças que me fizeram crescer.

Aos professores do Instituto de Química da UFRJ por todo ensinamento que contribuiu para minha formação.

À banca avaliadora, composta pela Prof^a Dr^a Débora França de Andrade e pelo Prof. Dr. Vinícius Tadeu Kartnaller Montalvão por terem aceitado o convite e pelos comentários para melhoria.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho. Especialmente a equipe do LAGOA-LADETEC, Karen Stelzer, Raquel Vieira, Thamara Barra, Vanessa Nunes, Ananda Antônio, Alexander Lopes, Gleicielle Wurzler, Kelly Soares, Karoline Santos, Beatriz Moraes, Marco Dal Sasso, Gutierri Salgueiro e Bárbara Ávila.

RESUMO

A utilização da técnica de GC×GC-TOFMS possibilitou a caracterização abrangente em nível molecular dos compostos orgânicos de uma amostra de testemunho de sedimento de lagoa costeira, sendo agrupados entre as classes: hopanoides, esteroides, esterenos, olefinas, álcoois, *n*-alcanos e cetonas. O estudo partiu de análises em triplicata da amostra por um método convencional com coluna ¹D de 30 m e da aplicação de um planejamento fatorial 2² com ponto central em um conjunto de métodos *fast* com coluna ¹D de 10 m para a técnica de GC×GC-TOFMS para a avaliação das variáveis referentes ao espectrômetro de massas (voltagem da fonte de ionização e taxa de aquisição). Foram aplicados testes estatísticos, como análise de variância, método de superfície de tendência e gráficos de Pareto avaliando-se como variáveis-resposta a relação sinal/ruído de íons diagnósticos e moleculares, bem como a concentração obtida para cada classe em seus respectivos ensaios. As análises realizadas pelo método convencional permitiram a obtenção dos valores de intervalo de confiança a 95% de confiança para a concentração total de cada uma das classes, bem como o cálculo do desvio padrão relativo (DPR%), em que os valores determinados não excederam 10%, além disso a determinação do valor *p* indicou que as 3 análises são estatisticamente equivalentes. A comparação das concentrações obtidas no método convencional com os métodos *fast* por análise de variância 1 fator indicou que os métodos utilizando 70 e 50 eV são estatisticamente equivalentes ao método convencional para todas as classes analisadas. O comparativo entre os métodos *fast* pelos gráficos de Pareto usando a relação S/N como resposta indicou que somente a variável voltagem foi significativa para a obtenção de melhores relações S/N dos íons diagnósticos para a classe de esteroides, o que não foi observado tanto para as demais classes, quanto para a relação S/N do íon molecular. Já pelo método da superfície de tendência foi observado que as relações S/N tanto de íons diagnósticos quanto moleculares há uma indicação da condição experimental mais otimizada, correspondendo ao método de 70 eV e 300 espectros s⁻¹ para grande parte das classes analisadas. O estudo proposto mostrou que mudança de um método convencional por um *fast* resultou na diminuição do tempo de análise de 60 para 20 min, mantendo-se a resolução cromatográfica em valores suficientemente bons para uma boa separação, além da indicação do método *fast* mais adequado e estatisticamente equivalente ao convencional, correspondendo ao método *fast* 70 eV e 300 espectros s⁻¹.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da região do Parque Nacional da restinga de Jurubatiba (em vermelho) com fotografia aérea da Lagoa das Garças, Quissamã. Adaptado de ICMBio (2007).....	10
Figura 2. Representação esquemática da estratificação térmica da coluna d'água de um sistema lacustre. Gonçalves (2001).....	11
Figura 3. Estruturas químicas de algumas substâncias encontradas em sedimentos, dentre elas uma parafina (A) n-alcano C ₁₉ , e dois biomarcadores (B) terpano pentacíclico (hopano) e (C) esteroi (estigmasterol).....	12
Figura 4. Esquema representativo das duas formas de atingir a separação de substâncias que coeluem usando GCxGC-TOFMS. Adaptado Semard (2009).....	15
Figura 5. Esquematização quanto ao planejamento 2 ² com ponto central (TEÓFILO e FERREIRA., 2005). 17	17
Figura 6. Diagrama do modelo de planejamento fatorial completo do tipo 2 ² com replicatas no ponto central aplicado. Nos vértices e no centro são mostradas as combinações entre os fatores.....	28
Figura 7. Cromatogramas de íons totais do sedimento obtidos por (a) GCxGC-TOFMS (replicata 3) e (b) Fast-GCxGC-TOFMS (70 eV e 300 spectros s ⁻¹) mostrando região de eluição das classes identificadas.....	30
Figura 8. Espectros de massas experimentais obtido para um composto hopanoide e um esteroide, mostrando seus respectivos íons diagnósticos.	31
Figura 9. Distribuição em porcentagem de massa relativa das classes de substâncias quantificadas no corte do testemunho analisado por GCxGC-TOFMS e fast-GCxGC-TOFMS.....	36
Figura 10. Ampliação dos cromatogramas de íons extraídos via GCxGC-TOFMS da replicata 1, mostrando a região de eluição dos (a) hopanóides, m/z 191; (b) esteróis, m/z 213 + 215.	37
Figura 11. Gráficos de Pareto mostrando efeitos das variáveis sobre a resposta de esteroides e n-alcacos.	42
Figura 12. Superfície de resposta para voltagem da fonte de ionização (eV) vs.taxa de aquisição (espectros s ⁻¹) para as classe de esteróides e hopanoides.	44
Figura 13. Gráficos de Pareto e superfície de resposta obtido para a variável resposta relação sinal-ruído obtida para os íons diagnósticos e íons moleculares para os analitos selecionados de cada classe.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz de planejamento para um planejamento fatorial completo 2^2 com ponto central.....	18
Tabela 2. Análise de variância para regressão múltipla (TEÓFILO e FERREIRA, 2005)	20
Tabela 3. Coordenadas geográficas do ponto de coleta das amostras.	24
Tabela 4. Parâmetros instrumentais para análise da fração neutra dos extratos dos sedimentos por GC×GC-TOFMS e fast-GC×GC-TOFMS	27
Tabela 5. Planejamento fatorial completo do tipo 2^2 com réplicas no ponto central utilizado no desenvolvimento de método para análise de fast-GC×GC, com suas variáveis e valores selecionados.	28
Tabela 6. Relação dos íons diagnósticos (m/z) aplicados para a obtenção das relações sinal/ruído utilizadas na construir dos gráficos de superfície de resposta	29
Tabela 7. Listagem das faixas de carbono das substâncias acíclicas identificadas por GC×GC-TOFMS e Fast- GC×GC-TOFMS.....	32
Tabela 8. Listagem dos hopanoides, esteróis e esterenos identificados por GC×GC-TOFMS e fast- GC×GC-TOFMS.	33
Tabela 9. Concentração total (ng g^{-1}) de cada classe de substâncias identificadas no corte do testemunho por GC×GC-TOFMS e fast-GC×GC-TOFMS.....	35
Tabela 10. Valores de seletividade (GC×GC α) e resolução cromatográfica (GC×GC R_s) mensurados para os métodos cromatográficos convencional e fast (70;300) a partir de pares de analitos selecionados e suas respectivas equações	38
Tabela 11. Valores de altura do prato teórico (H) mensurados para os métodos cromatográficos convencional e fast (70;300) a partir de analitos selecionados e suas equações.	38
Tabela 12. Resumo estatístico de cada classe de substâncias identificadas no sedimento superficial analisado por GC×GC-TOFMS.	40
Tabela 13. Valores de $F_{\text{calculado}}$ e $F_{\text{crítico}}$ para cada classe obtidos por ANOVA: 1 fator para o comparativo entre os métodos fast e convencional.	41
Tabela 14. Parâmetros estatísticos para o modelo linear de interação relacionados à voltagem da fonte de ionização (X_1) e à taxa de aquisição (X_2) para a relação sinal/ruído dos íons diagnósticos da classe de esteroides.	45
Tabela 15. Parâmetros estatísticos para o modelo linear de interação relacionados à voltagem da fonte de ionização (X_1) e à taxa de aquisição (X_2) para a relação sinal/ruído dos íons diagnósticos da classe de esteroides.	47

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Resolução cromatográfica.....	14
Equação 2. Resolução cromatográfica bidimensional	14
Equação 3. Número de pratos teóricos	14
Equação 4. Altura equivalente a um prato teórico	14
Equação 5. Seletividade	15
Equação 6. Seletividade bidimensional.....	15
Equação 7. Soma dos quadrados totais.....	19
Equação 8. Soma dos quadrados dos resíduos	19
Equação 9. Média quadrática	19
Equação 10. Soma quadrática da regressão	19
Equação 11. Soma quadrática dos resíduos	19
Equação 12. Soma quadrática do erro puro	19
Equação 13. Soma quadrática da falta de ajuste.....	20
Equação 14. Intervalo de confiança	21
Equação 15. Valor considerando intervalo de confiança	21
Equação 16. Desvio padrão relativo (%)	40

SUMÁRIO

RESUMO	4
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE EQUAÇÕES	7
1. INTRODUÇÃO	10
1.1. PARQUE NACIONAL DA RESTINGA DE JURUBATIBA - LAGOA DAS GARÇAS	10
1.2. ECOSISTEMA COSTEIRO E MATERIA ORGÂNICA	11
1.3. CROMATOGRAFIA GASOSA	13
1.3.1. DA GC À GCxGC	13
1.3.2. FAST-GCxGC	16
1.4. PLANEJAMENTO FATORIAL E ESTATÍSTICA	16
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. MATERIAL	24
4.2. PADRÕES	24
4.3. AMOSTRAS	24
4.4. PREPARO DAS AMOSTRAS	25
4.4.1. LIOFILIZAÇÃO E EXTRAÇÃO POR SOLVENTE	25
4.4.2. SAPONIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	25
4.5. INSTRUMENTAÇÃO	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. AVALIAÇÃO QUALITATIVA E SEMI-QUANTITATIVA	30
5.1.1. AVALIAÇÃO QUALITATIVA	30
5.1.2. AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA	35
5.1.3. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS	37
5.2. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA	40
5.2.1. INTERVALO DE CONFIANÇA: ANÁLISE CONVENCIONAL (GCxGC-TOFMS)	40
5.2.2. ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA: 1 FATOR): FAST x CONVENCIONAL	41
5.2.3. GRÁFICO DE PARETO E SUPERFÍCIE DE RESPOSTA: FAST-GCxGC-TOFMS	42
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
7. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50

APÊNDICE **54**

A.	CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR GC×GC-TOFMS NO MÉTODO CONVENCIONAL,	54
B.	CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR <i>FAST</i>-GC×GC-TOFMS,	55
C.	ESPECTROS DE MASSAS	57
D.	GRÁFICOS DE PARETO DE CADA CLASSE	59
E.	SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DE CADA CLASSE	61
F.	DETALHAMENTO ESTATÍSTICO	63

ANEXO **71**

1. INTRODUÇÃO

1.1. PARQUE NACIONAL DA RESTINGA DE JURUBATIBA - LAGOA DAS GARÇAS

O Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ) é uma Unidade de Conservação instituída em 29 de abril de 1998, localizada ao longo da faixa costeira nordeste do estado do Rio de Janeiro (**Figura 1**), abrangendo parte dos municípios de Macaé, Carapebus e Quissamã. O PNRJ possui um total de 18 lagoas costeiras distribuídas ao longo de seus 44 km de extensão. As lagoas se diferenciam em decorrência de fatores como salinidade, comprimento e perenidade, além de representar o trecho de restinga mais bem conservada de toda a costa fluminense (CARAMASCHI *et al.*, 2004; FOLHARINI *et al.*, 2020).

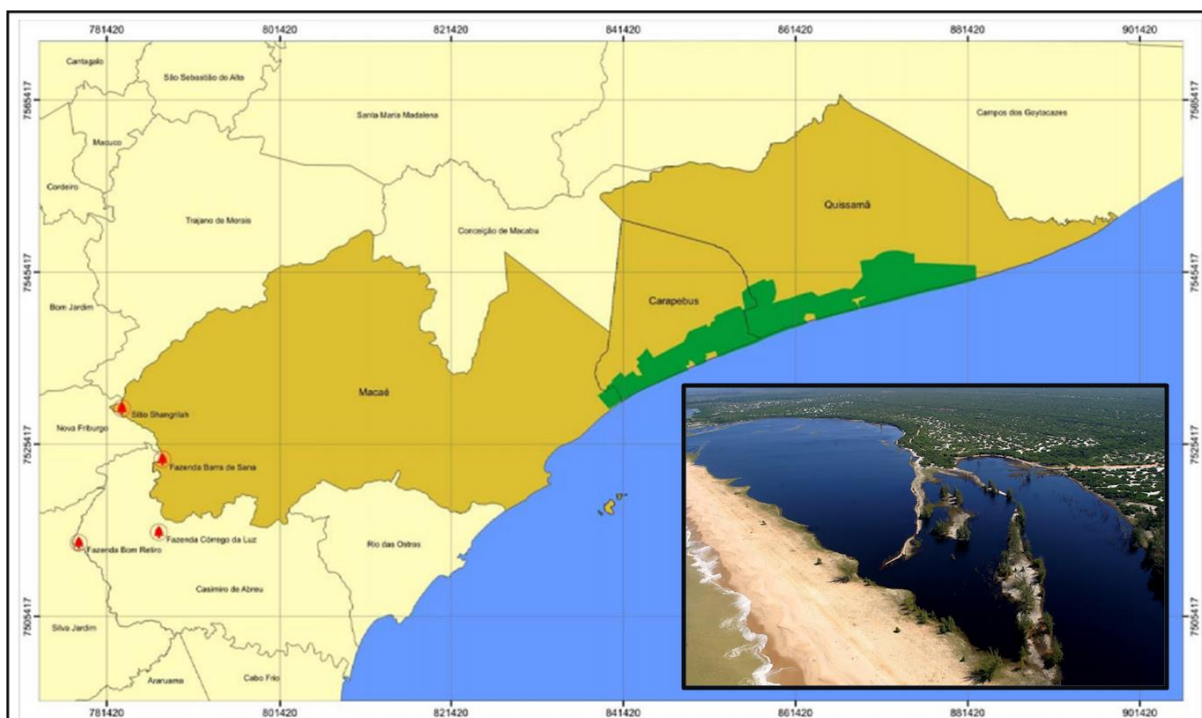


Figura 1. Mapa da região do Parque Nacional da restinga de Jurubatiba (em vermelho) com fotografia aérea da Lagoa das Garças, Quissamã. Adaptado de ICMBio (2007).

Localizada no município de Quissamã, a Lagoa das Garças faz parte do sistema de lagoas costeiras da unidade de conservação, sendo esta a que apresenta maior distância ao mar. É uma lagoa doce de pequeno porte e regime temporário, apresentando um fundo lamoso, com uma coluna d'água de aproximadamente 40 cm de profundidade e uma área de 0,64 km². Localiza-se em uma região de restinga entredunas com poucas áreas planas,

o que permite a formação de poças resistentes ao período de estiagem, que são mantidas pelo lençol freático (CARAMASCHI *et al.*, 2004).

1.2. ECOSSISTEMA COSTEIRO E MATERIA ORGÂNICA

As restingas são *habitats* característicos do bioma da Mata Atlântica que ocorrem paralelamente à costa e são constituídos por um conjunto de ecossistemas de comunidades vegetais fisiologicamente distintas localizadas em terrenos arenosos que podem ter origem marinha, lagunar, fluvial e/ou eólica. Esses terrenos podem ter depressões que dão origem a ecossistemas aquáticos, como os de lagoas costeiras (CONAMA, 1999; ENRICH-PRAST *et al.*, 2004).

As lagoas costeiras apresentam altas taxas de produtividade primária e secundária, sendo ambientes comuns em planícies costeiras ao longo do globo, ocupando cerca de 13% de áreas litorâneas. São definidas como um corpo aquático raso e separado do oceano por uma barreira que apresenta uma conexão intermitente com o mesmo. Sua formação é dependente de fatores como o histórico do nível do mar, a hidrodinâmica da costa e amplitude das marés, que influenciam na formação de barreiras (DAY *et al.*, 1982; ENRICH-PRAST *et al.*, 2004).

Esses ambientes apresentam a estratificação térmica da coluna d'água como fenômeno fundamental em sua dinâmica (**Figura 2**). Ela ocorre devido a má distribuição de calor, com isso apresentam três camadas distintas: epilímnio (superficial e de águas menos densas e mais quentes), metalímnio (porção intermediária que apresenta um gradiente de temperatura) e hipolímnio (de águas mais densas e mais frias) (GONÇALVES, 2001).

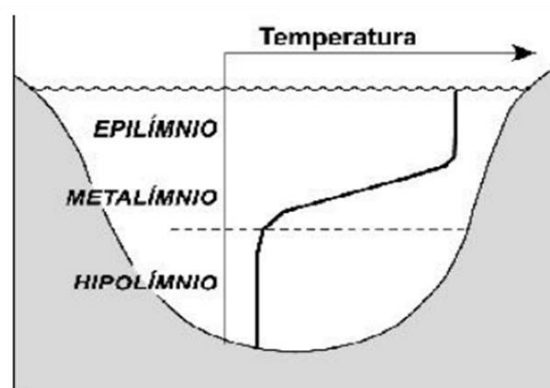


Figura 2. Representação esquemática da estratificação térmica da coluna d'água de um sistema lacustre. Gonçalves (2001).

Apesar da sua alta produtividade, lagoas costeiras são consideradas fenômenos de curta durabilidade em escala geológica, podendo apresentar grandes variações em seu nível ao longo do tempo, o que ocasiona em graus de salinidades diversos. As variações em seus níveis se relacionam com a taxa de sedimentação e com o acúmulo de matéria orgânica (MO) no sedimento (ESTEVEZ, 1998; ENRICH-PRAST *et al.*, 2004).

Apesar dessa intensa mineralização da matéria orgânica, alguns compostos, denominados biomarcadores (**Figura 3**), permanecem inalterados ou sofrem poucas mudanças em suas estruturas moleculares durante os processos diagenéticos, como terpanos pentacíclicos e esteróis. A partir da determinação dessas substâncias e de suas concentrações é possível correlacioná-las a seus precursores e com a origem deposicional dos sedimentos (EGLINTON e CALVIN, 1967).

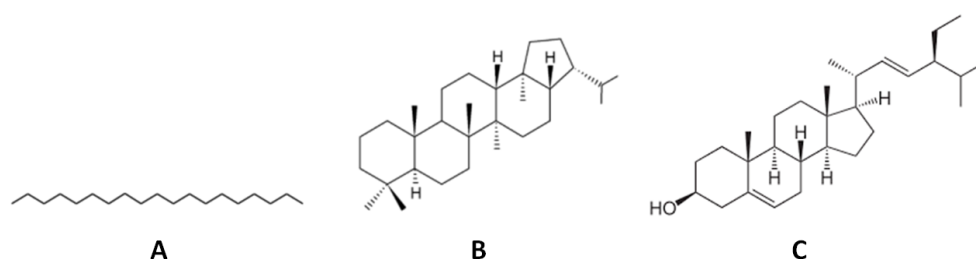


Figura 3. Estruturas químicas de algumas substâncias encontradas em sedimentos, dentre elas uma parafina (**A**) *n*-alcano C₁₉, e dois biomarcadores (**B**) terpano pentacíclico (hopano) e (**C**) esterol (estigmasterol).

Dessa forma, a determinação dessas substâncias é muito importante para a geoquímica ambiental, que envolve estudos sobre a origem, transporte, alteração e destino final de compostos orgânicos, permitindo a caracterização de ambientes aquáticos (MARTINS, 2007). Por esta razão, diversos trabalhos com enfoque na caracterização de ambientes aquáticos a partir de biomarcadores foram realizados utilizando técnicas cromatográficas, como LOPES *et al.* (2021) que fez uso de cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (GC-FID), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia gasosa acoplada a forno de combustão e espectrômetro de massas de razão isotópica (GC-C-IRMS) para determinar fatores como a fonte de biomassa predominante e concentração de oxigênio a partir da matéria orgânica de sedimentos de lagos da Amazônia brasileira.

1.3. CROMATOGRAFIA GASOSA

1.3.1. Da GC à GCxGC

A cromatografia gasosa unidimensional (GC) é uma técnica analítica bastante útil para a separação e determinação de compostos semi voláteis com uma boa capacidade de pico, separando entre 100-150 picos ou mais em uma única análise. Por meio dessa técnica é possível identificar e quantificar compostos orgânicos de misturas com boa resolução, precisão e robustez. Entretanto, amostras de matrizes como alimentos, petroquímicos e ambientais são muito complexas, contendo muitos compostos com pressões de vapor que não diferem o suficiente, fazendo com que ocorram coeluições (RAMOS e BRINKMAN, 2009; ADAHCHOUR *et al.*, 2006).

Considerando-se as limitações da cromatografia gasosa unidimensional (GC), uma forma de aumentar o poder de separação foi o acoplamento de duas colunas cromatográficas por meio de uma interface, dando origem a técnicas cromatográficas mais avançadas, tais como a cromatografia gasosa multidimensional (MDGC) e a cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC) (RAMOS e BRINKMAN, 2009; ADAHCHOUR *et al.*, 2006).

Ambas as técnicas supracitadas fazem uso de duas colunas cromatográficas de mecanismos de separação distintos e conectadas em série por uma interface. No caso da MDGC, a interface que conecta as colunas é denominada *heartcut*, que direciona uma determinada fração do eluente da primeira dimensão para um detector, ou para a segunda dimensão, onde ocorre uma segunda separação. Já no caso da cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC), a interface entre as colunas é chamada modulador, sendo capaz de focalizar e reinjetar todo o eluente da primeira dimensão para a segunda, ocorrendo uma outra separação, sendo portanto uma técnica abrangente, o que aumenta significativamente a resolução para todos os constituintes da amostra e minimiza coeluições, permitindo uma análise mais abrangente da amostra (RAMOS e BRINKMAN, 2009).

Assim como a cromatografia gasosa unidimensional, a GCxGC apresenta parâmetros importantes que se relacionam com a qualidade da separação cromatográfica, como a resolução (R_s), a eficiência (N) e a seletividade (α). A resolução é mensurada separadamente para as colunas da primeira e segunda dimensões a partir dos tempos de retenção e a largura do pico na linha de base (w_b) de dois picos consecutivos, usando a equação 1:

Equação 1. Resolução cromatográfica

$$R_S = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(w_{b2} + w_{b1})/2}$$

A resolução total do sistema é dada pela raiz quadrada da soma dos quadrados das resoluções das colunas (equação 2), resultando sempre em um valor maior ou igual ao maior valor de resolução individual das colunas:

Equação 2. Resolução cromatográfica bidimensional

$$GC \times GC R_S = \sqrt{({}^1DR_S)^2 + ({}^2DR_S)^2}$$

Um valor de $R_S > 1$ é o mínimo para a uma separação mensurável e uma quantificação adequada. Um valor de $R_S > 0,6$ é necessário para diferenciar um vale entre dois picos de mesma altura.

A eficiência é obtida relativamente a um analito, podendo ser mensurada pelo número de pratos teóricos (N), de modo que quanto maior o valor de N, melhor a eficiência, ou pela altura equivalente a um prato teóricos (H), sendo inversamente proporcionais, como mostrado abaixo. A eficiência (N) é inversamente proporcional a largura da base do pico cromatográfico. Quanto mais fino o pico, maior a altura do pico, menor a largura do pico e então, maior a eficiência N do sistema cromatográfico para o analito em avaliação (LANÇAS e McNAIR, 1983).

Equação 3. Número de pratos teóricos

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

Equação 4. Altura equivalente a um prato teórico

$$H = \frac{L}{N}$$

A seletividade (α), também denominada de separação, é medida a partir da razão entre os valores do tempo de retenção de dois picos consecutivos, a partir das equações 5 e 6, de modo que se a seletividade tem seu valor maior que 1, melhor será a separação alcançada (LANÇAS e McNAIR, 1983).

Equação 5. Seletividade

$$\alpha = \frac{t_{R2}}{t_{R1}}$$

Equação 6. Seletividade bidimensional

$$GC \times GC \alpha = \sqrt{({}^1D\alpha)^2 + ({}^2D\alpha)^2}$$

A GCxGC também apresenta características próprias, como ortogonalidade, que se relaciona com os mecanismos de separação do conjunto de colunas cromatográficas utilizado, sendo maior para mecanismos estatisticamente independentes (SANZ, 2009; ADAHCHOUR *et al.*, 2006).

Aliada a boa resolução cromatográfica, a hifenação da cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC) com um espectrômetro de massas por tempo de voo (TOFMS), que apresenta taxas de aquisição de até 500 Hz, resulta em uma ferramenta analítica poderosa para a detecção, identificação e quantificação de substâncias em misturas complexas. A técnica hifenada é considerada um sistema de quatro dimensões, tendo os tempos de retenção da primeira e segunda dimensões (1t_R e 2t_R), a intensidade do analito e a informação do seu espectro de massas. Essa combinação permite resolver possíveis problemas de coeluições a partir da deconvolução espectral, que distingue substâncias de tempos de retenção muito próximos a partir das diferenças entre seus respectivos perfis de fragmentação (**Figura 4**) (SEMARD *et al.*, 2006).

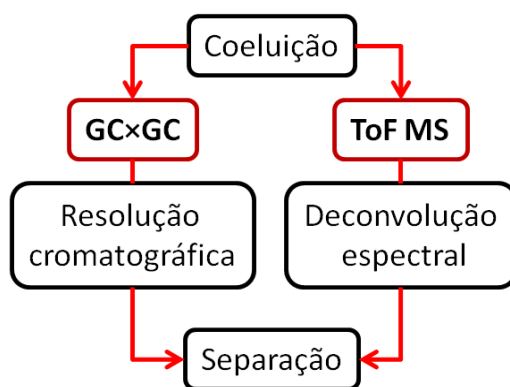


Figura 4. Esquema representativo das duas formas de atingir a separação de substâncias que coeluem usando GCxGC-TOFMS. Adaptado Semard (2009).

1.3.2. *Fast-GC×GC*

Amostras de matrizes complexas tem sido amplamente analisadas por cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massas por tempo de voo (GC×GC-TOFMS) utilizando uma coluna longa na primeira dimensão, de aproximadamente 30 m, uma coluna mais curta na segunda dimensão, de até 2 m, e uma programação de temperatura com taxas de aquecimento baixas, de até 5 °C min⁻¹, o que gera uma corrida cromatográfica de 1 h ou mais por amostra (SCHENA *et al.*, 2020).

A fim de melhorar a produtividade laboratorial e reduzir os custos de análise, é possível adotar métodos rápidos de *fast-GC×GC* capazes de reduzir significativamente o tempo de análise. Segundo SEQUINEL *et al.* (2010) as condições instrumentais que permitem uma análise mais rápida incluem uma coluna cromatográfica mais curta na primeira dimensão combinada com uma programação de temperatura com taxa de aquecimento elevada, o que reduz tanto a resolução cromatográfica quanto o número de pratos teóricos a valores mínimamente suficientes para uma boa separação. Uma alternativa que compense a perda de resolução com a diminuição do comprimento da coluna é a utilização de uma coluna curta, mas com diâmetro interno reduzido. Além da redução no tempo de análise, também há melhora na relação sinal/ruído (S/N), aumentando a sensibilidade do método (SCHENA *et al.*, 2020).

Além das configurações cromatográficas, a avaliação de parâmetros instrumentais do espectrômetro de massas (TOFMS) também tem resultados positivos sobre a eficiência da análise. SCHENA *et al.* (2020) avaliaram diferentes valores de taxas de aquisição para análise de bio-óleos por *fast-GC×GC-TOFMS*, observando que a utilização de taxas de aquisição elevadas, maiores que 200 espectros s⁻¹, resultam na diminuição do sinal do ruído, além de um maior número de analitos identificados, proporcionando uma melhora na qualidade da análise. DUBOIS *et al.* (2017) estudaram diferentes valores de voltagem da fonte de ionização para análise de compostos orgânicos voláteis em matriz biológica por GC×GC-TOFMS, observando que valores abaixo de 70 eV resultaram em uma melhor identificação dos analitos, bem como a distinção de isômeros, sendo possível detectar com mais facilidade íons de estruturas mais relevantes, além do íon molecular.

1.4. PLANEJAMENTO FATORIAL E ESTATÍSTICA

Um planejamento fatorial é utilizado para se investigar as influências das variáveis experimentais e seus efeitos de interação sobre uma determinada resposta. Para uma

combinação de k fatores avaliados em 2 níveis, no planejamento fatorial serão realizados 2^k experimentos, de modo que os fatores são nomeados com sinais negativo e positivo, respectivamente, para o nível mais baixo e mais alto. Para um planejamento fatorial completo, os experimentos são realizados em todas as combinações possíveis dos níveis dos fatores, desta forma para um planejamento experimental completo do 2^k realizado sobre duas variáveis ($k=2$) o número de experimentos será de 4 (BARROS NETO *et al.*, 2001).

Em alguns casos, a realização de repetições verdadeiras pode não ser muito conveniente. Desta forma, para se obter uma boa estimativa dos erros, são incluídos experimentos no centro do planejamento, correspondendo ao valor médio dos níveis de todas as variáveis avaliadas, sendo codificados como nível zero, como mostrados na **figura 5** e **tabela 1** abaixo. Este tipo de planejamento permite minimizar o risco de se perder a relação não linear entre os intervalos, além de permitir que um modelo razoável seja estimado, verificando se há falta de ajuste (TEÓFILO e FERREIRA, 2005).

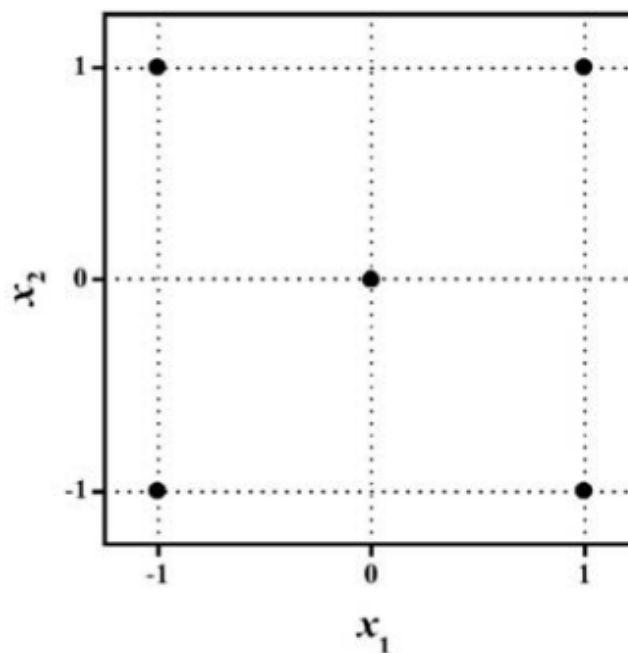


Figura 5. Esquematização quanto ao planejamento 2^2 com ponto central (TEÓFILO e FERREIRA., 2005).

Tabela 1. Matriz de planejamento para um planejamento fatorial completo 2^2 com ponto central.

Nº experimento	Variável	
	X ₁	X ₂
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	0	0

A utilização de um planejamento fatorial permite também a obtenção de superfícies de resposta e diagramas de Pareto. O método da superfície de resposta se baseia em um modelo matemático empírico que emprega funções polinomiais lineares ou quadráticas a fim de se descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, indicando os melhores valores que as variáveis estudadas podem assumir a fim de se obter a melhor resposta desejada, ao se encontrar a região ótima na superfície definida pelos fatores (TEÓFILO e FERREIRA, 2005). O diagrama de Pareto é uma ferramenta estatística para o controle de qualidade, sendo constituído por um gráfico de barras construído para mostrar, em ordem de importância, as causas de variações referentes à uma determinada resposta (VIEIRA, 2012).

Uma forma de se estudar a qualidade do ajuste de um determinado modelo é empregando a análise de variância (ANOVA), cujo princípio básico é avaliar se as diferenças observadas entre as médias das amostras são significativas. Essa variabilidade das amostras pode ser dividida em duas partes, uma proveniente das populações serem diferentes, denominada variabilidade *entre*, de modo que quanto maior a variabilidade, maior a evidência de que as médias são diferentes; e outra proveniente das diferenças *dentro* de cada amostra, de forma que quanto maior, mais difícil de se concluir se as médias das populações são distintas, ou não (LAPOONI, 2005).

Na ANOVA, para a avaliação de um modelo, a variação total da resposta (SQ_{total}) é dada pela soma da soma quadrática da regressão (SQ_{reg}) com a soma quadrática dos resíduos (SQ_{res}), sendo este último, definido como a soma da soma quadrática do erro puro (SQ_{ep}) com a soma quadrática da falta de ajuste (SQ_{faj}). O erro puro se relaciona unicamente com os erros aleatórios das replicatas, enquanto a falta de ajuste é uma medida

da discrepância entre as respostas do modelo e a média das replicatas. As equações simplificadas podem ser observadas nas **equações 7 e 8** (TEÓFILO e FERREIRA, 2005).

Equação 7. Soma dos quadrados totais

$$SQ_{total} = SQ_{regressão} + SQ_{resíduos}$$

Equação 8. Soma dos quadrados dos resíduos

$$SQ_{resíduos} = SQ_{falta\ de\ ajuste} + SQ_{erro\ puro}$$

Para cada fonte de variação (regressão, resíduos, falta de ajuste e erro puro) tem-se associado um número de graus de liberdade específico (**tabela 2**) a partir do qual se calcula a média quadrática (MQ) para cada fonte de variação, como mostrado na equação 9.

Equação 9. Média quadrática

$$MQ = \frac{SQ}{\text{graus de liberdade}}$$

Equação 10. Soma quadrática da regressão

$$SQ_{regressão} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{r_i} (y_i - y_{médio})^2$$

Equação 11. Soma quadrática dos resíduos

$$SQ_{resíduos} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{r_i} (y_{ij} - y_{i\ estimado})^2$$

Equação 12. Soma quadrática do erro puro

$$SQ_{erro\ puro} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{r_i} (y_{ij} - y_{i\ médio})^2$$

Equação 13. Soma quadrática da falta de ajuste

$$SQ_{falta\ de\ ajuste} = \sum_{i=1}^m (y_i\ estimado - y_i\ médio)^2$$

Tabela 2. Análise de variância para regressão múltipla (TEÓFILO e FERREIRA, 2005)

Fonte de Variação	SQ	Nº Graus de liberdade*	MQ	F
Regressão	SQ_{reg}	$p-1$	MQ_{reg}	(1) MQ_{reg}/MQ_{res}
Resíduos	SQ_{res}	$n-p$	MQ_{res}	
Falta de ajuste	SQ_{faj}	$m-p$	MQ_{faj}	(2) MQ_{faj}/MQ_{ep}
Erro puro	SQ_{ep}	$n-m$	MQ_{ep}	
Total	SQ_{total}	$n-1$		

(*) p = número de parâmetros (coeficientes); n = número de ensaios; m = número de níveis do planejamento

Como mostrado na tabela 2, ao se fazer a razão entre duas médias quadráticas equivale a razão de duas variâncias, dessa forma é possível comparar as fontes de variação através do teste F, da distribuição de Fischer, para os mesmos graus de liberdade a partir de um teste de hipóteses. Assim, tem-se a hipótese nula (H_0), que considera que não há diferenças entre as fontes de variação comparadas, e pode ser rejeitada com 5% de significância quando o valor de F calculado for maior que F tabelado para o nível de significância α adotado ($|F| > F_{tabelado}$), ou seja, $p \leq \alpha$, o que significa dizer que as fontes de variação comparadas são diferentes, definindo assim a hipótese alternativa (H_1) (LAPPONI, 2005; TEÓFILO e FERREIRA, 2005).

Resumidamente, é necessário que a regressão seja significativa e a falta de ajuste não seja significativo para que um modelo seja adequado, ou seja, a maior parte da variação total das observações em torno da média deve ser descrita pela regressão, enquanto a menor parte pelos resíduos, dentro dos quais a maior parcela deve advir do erro puro (erro experimental) e não da falta de ajuste, assim a razão (1) deve ser maior que $F_{tabelado}$, indicando que a regressão é mais significativa e a razão (2) deve ser menor que $F_{tabelado}$, indicando que a falta de ajuste não é significativa (TEÓFILO e FERREIRA, 2005).

Uma outra forma de se chegar a uma conclusão a partir de um teste de hipóteses é a avaliação do valor p frente a um nível de significância pré-estabelecido (α), de modo que se o valor p obtido for maior que o pré-estabelecido ($p > \alpha$) a hipótese (H_0) não é rejeitada, com isso para um valor p inferior ($p \leq \alpha$), a hipótese nula é rejeitada, aceitando-se a alternativa (H_0). Além disso, pode-se determinar do intervalo de confiança (IC) utilizando-

se a distribuição de *Student*, o desvio padrão (s) o número de observações (n), como visto na equação 10. (CHRISTENSEN, 2000)

Equação 14. Intervalo de confiança

$$IC = t_{(\alpha, n-1)} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Equação 15. Valor considerando intervalo de confiança

$$\mu = y_{m\u00e9dio} \pm t_{(\alpha, n-1)} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

2. JUSTIFICATIVA

As análises de compostos orgânicos em matrizes ambientais têm sido amplamente realizadas utilizando-se múltiplas técnicas cromatográficas unidimensionais com diferentes tipos de detectores, aliadas a um processo de preparo de amostra longo, como feito por LOPES *et al.* (2021). Nesse contexto, a utilização de um método rápido para a cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massas por tempo de voo (*fast-GC×GC-TOFMS*), permite tanto uma caracterização mais ampla da amostra em uma única análise, como também a otimização do tempo necessário sua realização, além disso, devido ao alto poder de separação da técnica, é possível ainda reduzir etapas do processo de preparo de amostras, minimizando perdas.

Atrelado a isso, a aplicação dos conceitos de cromatografia gasosa bidimensional abrangente rápida em amostras de matrizes ambientais tem ocupado espaço apenas recentemente (SCHENA *et al.*, 2022), mas a aplicação de análises com enfoque na caracterização de biomarcadores ambientais em sedimentos ainda é um campo inexplorado na literatura. Este é o primeiro trabalho a avaliar o uso do *fast-GC×GC* em análises de geoquímica orgânica ambiental.

3. OBJETIVOS

Este estudo consiste no desenvolvimento de um método de cromatografia gasosa bidimensional abrangente rápida acoplada a espectrometria de massas por tempo de voo (*fast-GC×GC-TOFMS*) com a otimização das variáveis relacionadas ao espectrômetro de massas (voltagem da fonte de ionização e a taxa de aquisição de espectros de massas). Bem como a aplicação no estudo de caso em extrato de sedimento superficial da Lagoa das Garças, pertencente ao Parque Nacional da Reserva de Jurubatiba, no município de Quissamã, Rio de Janeiro.

Para tanto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Identificar e determinar os níveis de concentração de compostos como *n*-alcanos, hopanoides e esteroides;
- Avaliar resolução cromatográfica, seletividade e eficiência do método de GC×GC convencional, e do método proposto de *fast-GC×GC*;
- Avaliar os diferentes valores de energia de ionização e taxa de aquisição por meio de gráficos de superfície de resposta e de Pareto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Os solventes utilizados foram diclorometano (Absolv), *n*-hexano (HPLC/Spectro) e metanol (HPLC/Spectro), fabricados por Tedia. Frascos de vidro de 2 mL e micro seringas de 10 a 500 µL calibradas foram utilizados (Agilent Technologies). A pesagem foi realizada em balança semi micro-analítica ($\pm 0,01$ mg) (Mettler Toledo).

Toda a vidraria utilizada será submetida a um processo de descontaminação conforme o procedimento a seguir: lavagem com água em abundância; lavagem com detergente comercial neutro; lavagem com água em abundância; imersão em solução de Extran alcalino 2% (Merck, Rio de Janeiro, Brasil) por, no mínimo, 24 horas; lavagem com água em abundância; rinsagem com água destilada; e o material não volumétrico foi levado a secagem em estufa a aproximadamente 105 °C. Os materiais não volumétricos foram ainda muflados a 450 °C por 3h antes do uso.

4.2. PADRÕES

Os padrões deuterados utilizados nas análises foram obtidos da CDN Isotopes (Quebec, Canadá) e apresentam pureza superior a 97%: *n*-hexadecano-D₃₄, decanol-D₂₁, *n*-tetracosano-D₅₀, pireno-D₁₀, ácido *n*-decanóico-D₁₉ e *n*-tetradecanol-D₂₆.

4.3. AMOSTRAS

A amostragem se deu com auxílio de um amostrador gravimétrico de 50 cm de comprimento, obtendo-se um testemunho de 40 cm em fevereiro de 2019 na Lagoa das Garças, região do Parque Nacional da Jurubatiba presente no município de Quissamã, Rio de Janeiro, cujas coordenadas geográficas são apresentadas na **Tabela 3**. O testemunho obtido foi fatiado a cada 2 cm e armazenado em câmara fria a -20 °C, e neste estudo foi utilizado o sedimento superficial, correspondente ao corte de 2 cm de profundidade.

Tabela 3. Coordenadas geográficas do ponto de coleta das amostras.

Local	Latitude	Longitude
Lagoa das Garças Quissamã, RJ	-41° 99' 07.8" O	-22° 21' 35.1" S

4.4. PREPARO DAS AMOSTRAS

4.4.1. Liofilização e extração por solvente

O sedimento foi liofilizado a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h até massa constante e macerado usando gral e pistilo. Aproximadamente 2 g foi pesada em balança semi-microanalítica ($\pm 0,00001$ g). Uma mistura de 50 mL diclorometano/metanol 9:1 foi utilizada como solvente, e o sedimento foi submetido a um processo de 3 extrações por solvente consecutivas em banho de ultrassom por 30 minutos intercaladas por centrifugação por 5 minutos e transferência do sobrenadante para um balão de fundo redondo. Ao final do processo, foi obtido um volume final de 150 mL que foi reduzido em evaporador rotativo a pressão reduzida e transferido para tubo de ensaio, onde foi levado a secura em fluxo de N_2 .

4.4.2. Saponificação e extração líquido-líquido

Após a total evaporação do solvente, o extrato foi submetido ao processo de saponificação, adicionando-se 1 mL de uma solução $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de KOH em metanol:água 9:1 (v:v). Após a adição da solução as amostras foram aquecidas a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 horas (CECCOPIERI *et al.*, 2018).

Em seguida, a fração neutra foi obtida por meio de extração líquido-líquido por 3 x 3 mL de *n*-hexano. A fração ácida foi obtida mediante acidificação com 1 mL de HCl 1 mol L^{-1} e extração líquido-líquido por 3 x 3 mL de uma mistura de *n*-hexano:acetato de etila 8:2 (v:v). As frações foram levadas à secura em fluxo de N_2 e pesadas.

O extrato da fração neutra foi então transferido para um frasco (1) de 2 mL usando 500 μL de diclorometano, seguido da transferência de 250 μL para outro frasco (2) para análises futuras. O extrato no frasco (1) foi transferido para um microfrasco de 150 μL e solubilizado a 100 μL usando como solvente uma solução em diclorometano de *n*-hexadecano- D_{34} e *n*-decanol- D_{21} a $20\text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ e $50\text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, respectivamente.

4.5. INSTRUMENTAÇÃO

Para as análises das frações dos extratos de sedimentos com foco nos biomarcadores, foi utilizado um sistema GCxGC-TOFMS modelo Pegasus 4D (Leco, St. Joseph, MI, EUA) com espectrômetro de massas com tempo de voo com fonte de ionização por elétrons, modelo Pegasus H11 (Leco, St. Joseph, MI, EUA). O equipamento consiste

em um cromatógrafo a gás modelo 7890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) equipado com um forno secundário, um modulador criogênico de quatro jatos e dois estágios. Os dados obtidos foram processados pelos *softwares* ChromaTOF® versão 4.51.6 e *Chemoface*.

Para as análises pelo método convencional e *fast*-GC×GC, o cromatógrafo a gás foi utilizado com as colunas na configuração apolar/polar. No método convencional, foi utilizada uma coluna DB-5 (5%-fenil-metilpolisiloxano) na primeira dimensão, e uma BPX-50 (50%-fenil-metilpolisiloxano) na segunda dimensão. Para o método de *fast*-GC×GC, uma coluna SE-52 (equivalente a DB-5) foi usada na primeira dimensão e a coluna da segunda dimensão foi mantida, como mostrado na **tabela 4**.

Tabela 4. Parâmetros instrumentais para análise da fração neutra dos extratos dos sedimentos por GCxGC-TOFMS e *fast*-GCxGC-TOFMS

Parâmetro	GCxGC	<i>fast</i> -GCxGC
Modo de injeção	<i>Splitless</i>	<i>Split</i>
Voltagem da fonte de ionização	70 eV	70, 60 e 50 eV
Taxa de aquisição	100 espectros s ⁻¹	100, 200 e 300 espectros s ⁻¹
Temperatura do injetor	310 °C	290 °C
Programação de temperatura ¹ D	70°C - 170°C à 20 °C min ⁻¹ 170 °C - 340°C à 3 °C min ⁻¹	70°C - 170°C à 30 °C min ⁻¹ 170 °C - 340°C à 10 °C min ⁻¹
Programação de temperatura ² D	10 °C acima da ¹ D	20 °C acima da ¹ D
Isoterma inicial	1 min	0,2 min
Temperatura do modulador	15 °C acima da ² D	
Período de modulação	5 s	
Coluna ¹ D	DB-5 Comprimento = 30 m Diâmetro interno = 250 µm Espessura do filme = 0,25 µm	SE-52 (MEGA) Comprimento = 10 m Diâmetro interno = 100 µm Espessura do filme = 0,1 µm
	BPX-50 (SGE) Comprimento = 0,9 m Diâmetro interno = 100 µm Espessura do filme = 0,1 µm	
Coluna ² D		
Gás de arraste	Hélio (1,50 mL min ⁻¹)	Hélio (0,80 mL min ⁻¹)
Tempo de corrida (aproximado)	60 min	20 min

As análises no método convencional foram realizadas em triplicata e os valores de concentração obtidos para os analitos de cada classe foram utilizados para obter os valores de **p** utilizando-se análise de variância por meio da ferramenta *Análise de dados* (ANOVA: fator único) do Excel. Além disso, a ferramenta *Estatística Descritiva* foi utilizada considerando um nível de significância de 95% obtendo-se assim os valores de intervalo de confiança e desvio padrão para a concentração total de cada classe.

As análises nos métodos *fast* foram realizadas utilizando o planejamento fatorial completo do tipo 2^k com 4 replicatas no ponto central (k=2), totalizando 8 análises. As variáveis selecionadas para a avaliação foram energia de ionização (variável 1) e taxa de aquisição (variável 2), como apresentado na **Tabela 5**. Os valores foram selecionados de

acordo com trabalhos previamente publicados da literatura e métodos estabelecidos (SCHENA *et al.*, 2020; FRANÇA *et al.* 2021). A seleção da energia e ionização foi determinada pela limitação do instrumento utilizado, que permite voltagens variando apenas de 50 a 70 eV.

Tabela 5. Planejamento fatorial completo do tipo 2^2 com réplicas no ponto central utilizado no desenvolvimento de método para análise de *fast*-GC×GC, com suas variáveis e valores selecionados.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Voltagem da fonte (eV)	50	60	70
Taxa de aquisição (espectros s ⁻¹)	100	200	300

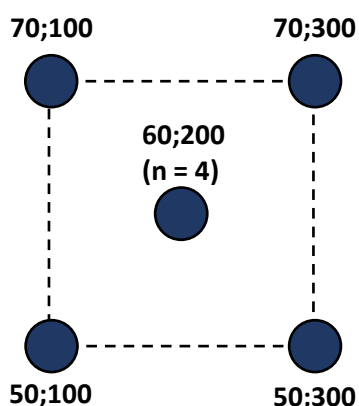


Figura 6. Diagrama do modelo de planejamento fatorial completo do tipo 2^2 com réplicas no ponto central aplicado. Nos vértices e no centro são mostradas as combinações entre os fatores.

Os resultados no método *fast* desenvolvido foram avaliados no modelo de planejamento fatorial em questão a partir de gráficos de Pareto e superfícies de resposta, utilizando-se a relação sinal/ruído de íons diagnósticos e moleculares como variável-resposta, avaliando-se separadamente para cada classe e também a partir de analitos selecionados (**Tabela 6**).

Tabela 6. Relação dos íons diagnósticos (m/z) aplicados para a obtenção das relações sinal/ruído utilizadas na construir dos gráficos de superfície de resposta

Substância	Íon diagnóstico (m/z)	Íon Molecular (m/z)
Trisnorhopeno	191	368
Colesterol	213	386
Estigmastadieno	213	368
Hexadeceno	55	224
Hexadecano	85	226
Heptadecanol*	55	238
Cosanona	58	296

(*) utilização do íon pseudo-molecular $[M-18]^+$, referente a perda de água.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO QUALITATIVA E SEMI-QUANTITATIVA

5.1.1. Avaliação qualitativa

Os resultados obtidos pelas análises cromatográficas permitiram identificar as substâncias de maior volatilidade e menor polaridade, essencialmente, hidrocarbonetos a partir dos métodos cromatográficos convencional e *fast*.

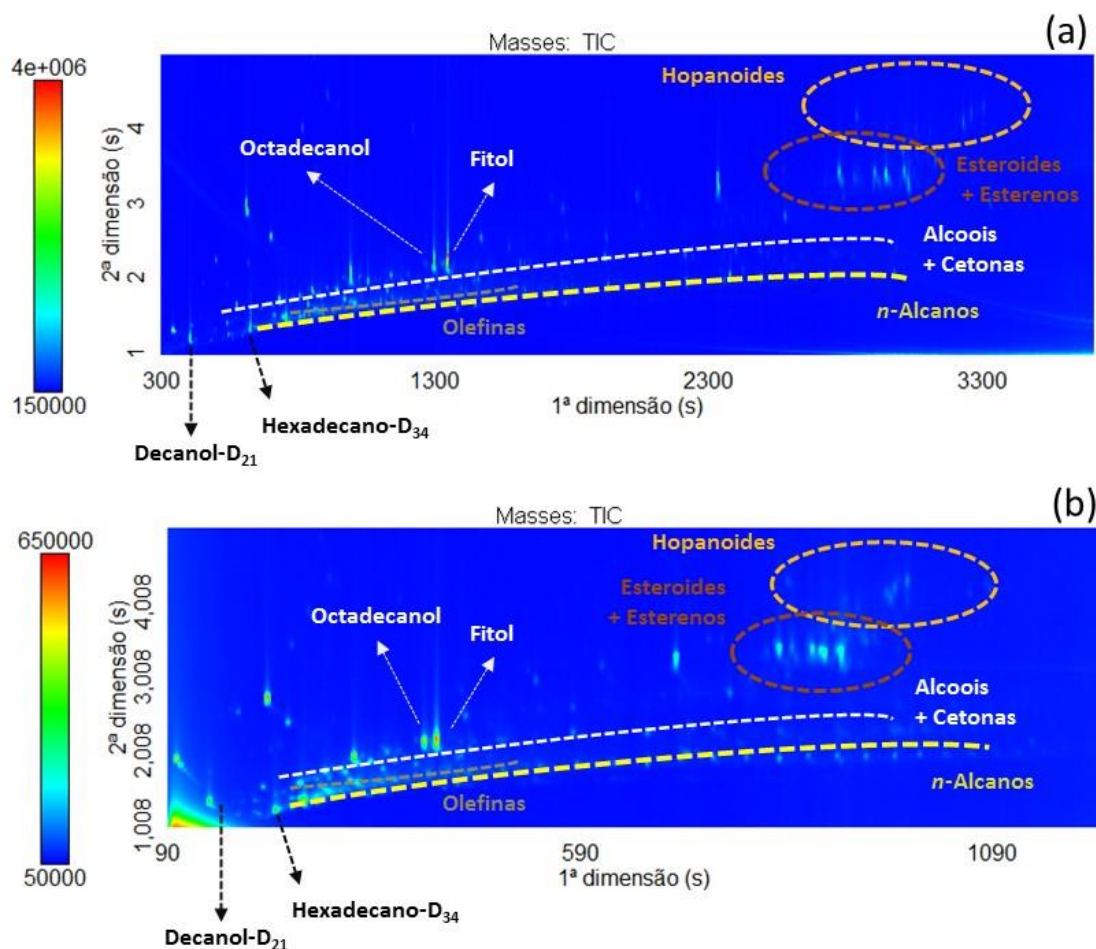


Figura 7. Cromatogramas de íons totais do sedimento obtidos por (a) GCxGC-TOFMS (replicata 3) e (b) *Fast*-GCxGC-TOFMS (70 eV e 300 spectros s⁻¹) mostrando região de eluição das classes identificadas.

A **Figura 7** ilustra os cromatogramas estruturados do sedimento obtidos por GCxGC-TOFMS utilizando o método convencional com coluna de 30 m na primeira dimensão e por *fast*-GCxGC-TOFMS utilizando o método rápido com coluna de 10 m na primeira dimensão, a partir da qual é possível observar que a mudança de método convencional para *fast* com a diminuição do comprimento da coluna da primeira dimensão de 30 m para 10 m não gerou

diferenças quanto às ordens de eluição das substâncias. A principal diferença observada foi a redução do tempo de retenção na primeira dimensão para todas as substâncias, proporcionando uma redução no tempo de corrida de 60 min para 20 min com o método *Fast*. Os demais cromatogramas podem ser observados nos **Apêndices A e B**.

Os tempos de retenção e as ordens de eluição dos padrões internos deuterados no plano cromatográfico permitem inferir a posição das classes de compostos presentes. Desta forma, foi observado que as classes químicas se organizam em séries homólogas dispostas em regiões específicas no cromatograma, de acordo com suas propriedades físico-químicas. Para a configuração de colunas cromatográficas utilizada (apolar/polar) os *n*-alcanos, álcoois, olefinas e cetonas organizam-se linearmente em séries homólogas demarcadas pelas linhas tracejadas, que se iniciam a partir de seus respectivos padrões internos (hexadecano-D₃₄ e decanol-D₂₁).

Em todos os casos, o aumento da massa molecular proporcionou um aumento no tempo de retenção na primeira dimensão (¹t_R), enquanto o aumento da polaridade proporcionou aumento no tempo de retenção da segunda dimensão (²t_R), desta forma álcoois > cetonas > olefinas > *n*-alcanos. Os hopanoides, esteroides e esterenos eluem em regiões de maiores tempos de retenção na primeira e segunda dimensões.

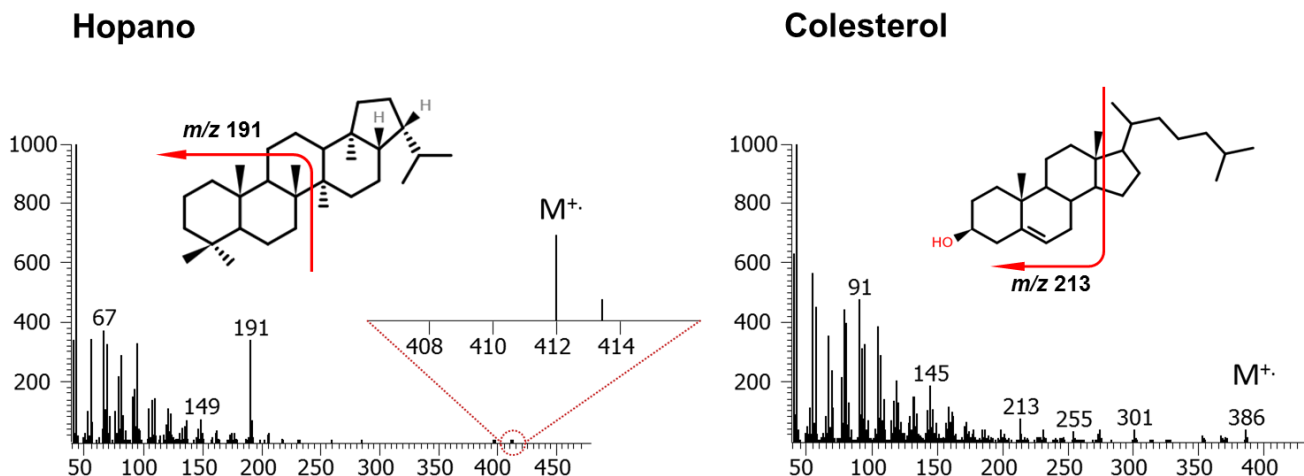


Figura 8. Espectros de massas experimentais obtido para um composto hopanoide e um esteroide, mostrando seus respectivos íons diagnósticos.

A identificação das substâncias no plano cromatográfico foi realizada por meio da obtenção de seus espectros de massas experimentais e comparação destes com os espectros de massas obtidos na literatura (PEREIRA, 2021) e na biblioteca NIST 2.0. As substâncias foram identificadas (**Tabelas 7 e 8**) a partir da seleção íons específicos para cada uma, sendo o pico base ou o íon característico, de modo que para os *n*-alcanos foi

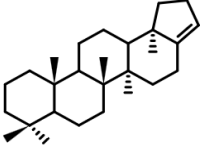
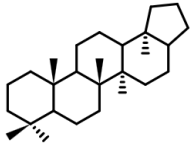
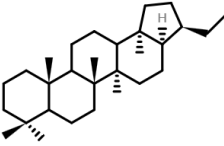
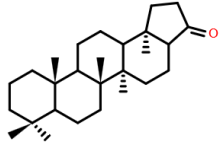
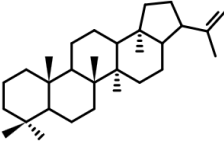
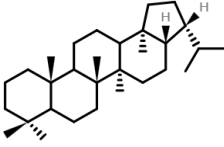
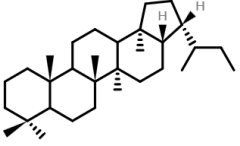
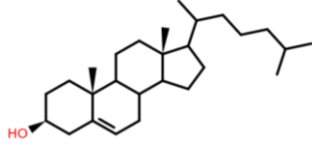
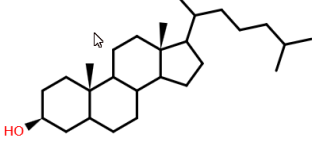
utilizado o m/z 85, para os álcoois e olefinas o m/z 55, para as cetonas o m/z 58, para os hopanoides o m/z 191, para os esteroides e esterenos os m/z 213 e m/z 215. Alguns espectros de massas obtidos podem ser observados na **Figura 8** e demais espectros de massas no **Apêndice C**.

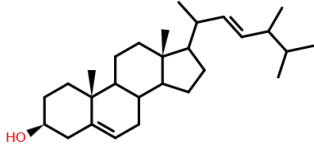
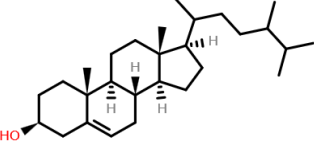
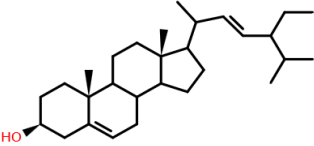
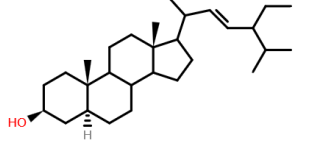
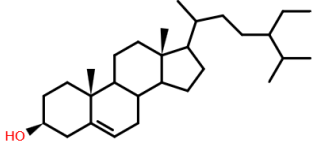
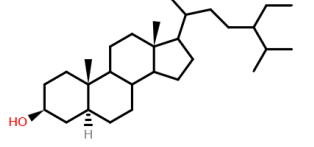
Tabela 7. Listagem das faixas de carbono das substâncias acíclicas identificadas por GCxGC-TOFMS e *Fast*-GCxGC-TOFMS.

Experimento	Classes			
	<i>n</i> -Alcanos	Olefinas	Álcoois	Cetonas
Convencional #1	C ₁₁ -C ₃₈	C ₁₅ -C ₂₂	C ₉ -C ₂₈	C ₉ -C ₃₄
Convencional #2	C ₁₁ -C ₃₉	C ₁₅ -C ₂₂	C ₉ -C ₂₇	C ₉ -C ₃₂ , C ₃₄
Convencional #3	C ₁₁ -C ₃₉	C ₁₅ -C ₂₂	C ₉ -C ₂₆	C ₉ -C ₃₄
<i>fast</i> 50;100	C ₁₆ -C ₄₂	C ₁₅ -C ₂₂	C ₁₂ -C ₁₉ ; C ₂₁ -C ₂₆	C ₁₀ -C ₂₉ , C ₃₁ -C ₃₂
<i>fast</i> 50;300	C ₁₆ -C ₄₂	C ₁₅ -C ₂₂	C ₁₂ -C ₁₉ ; C ₂₁ -C ₂₆	C ₁₀ -C ₃₂
<i>fast</i> 60;200-1	C ₁₆ -C ₃₄ , C ₃₆ -C ₄₀	C ₁₆ -C ₂₂	C ₁₃ -C ₂₆	C ₁₀ -C ₂₈ , C ₃₀ , C ₃₁
<i>fast</i> 60;200-2	C ₁₆ -C ₄₁	C ₁₆ -C ₂₂	C ₁₃ -C ₂₆	C ₁₀ -C ₂₈ , C ₃₀ , C ₃₁
<i>fast</i> 60;200-3	C ₁₆ -C ₄₃	C ₁₅ -C ₂₂	C ₁₂ -C ₁₉ ; C ₂₁ -C ₂₆	C ₁₀ -C ₂₆ , C ₂₈ , C ₂₉ , C ₃₁
<i>fast</i> 60;200-4	C ₁₆ -C ₄₂	C ₁₆ -C ₂₂	C ₁₃ -C ₂₆	C ₁₀ -C ₂₈ , C ₃₀
<i>fast</i> 70;100	C ₁₄ -C ₄₂	C ₁₆ -C ₂₂	C ₁₂ -C ₂₆	C ₁₀ -C ₃₃
<i>fast</i> 70;300	C ₁₆ -C ₄₂	C ₁₅ -C ₂₂	C ₁₄ -C ₂₈	C ₁₀ -C ₃₃

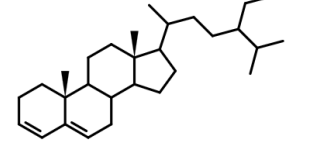
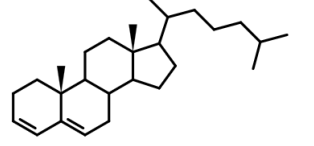
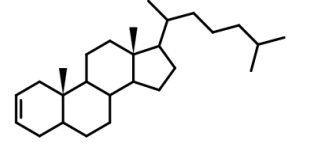
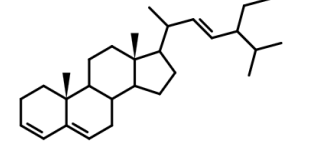
A observação da **Tabela 7** mostra que no método cromatográfico convencional e no *fast* houve diferenças quanto a faixa de carbono identificada para a classe de *n*-alcanos, de modo que no método *fast* não foram identificadas parafinas mais leves, na faixa de C₁₁-C₁₅, como observado no método convencional, entretanto o método favoreceu a identificação de parafinas mais pesadas, na faixa de C₃₈-C₄₂. Desta forma, os métodos se sobrepõem em uma faixa de carbono de C₁₆-C₃₉.

Tabela 8. Listagem dos hopanoides, esteróis e esterenos identificados por GCxGC-TOFMS e fast- GCxGC-TOFMS.

Nomenclatura	Símbolo	Estrutura	Massa Molecular (Da)	Fórmula
Hopanoides				
Trisnorhopeno (22,29,30-Trisnorhop-17(21)-eno)	$\Delta^{17(21)}\text{TNH}$		368	$\text{C}_{27}\text{H}_{44}$
Trisnorhopano (17 β (H)-22,29,30-Trisnorhopano)	TNH		370	$\text{C}_{27}\text{H}_{46}$
Norhopano (17 α (H),21 α (H)-30-Norhopano)	$\alpha\alpha\text{NH}$		398	$\text{C}_{29}\text{H}_{50}$
Trisnorhopanona (22,29,30-Trisnorhopan-21-ona)	TNHona		384	$\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}$
Diplopteno (Hop-22(29)-eno)	Dp		410	$\text{C}_{30}\text{H}_{50}$
Hopano (17 β (H),21 β (H)-Hopano)	$\beta\beta\text{H}$		412	$\text{C}_{30}\text{H}_{52}$
Homohopano (17 β (H),21 β (H)-Homohopano)	$\beta\beta\text{HH}$		426	$\text{C}_{31}\text{H}_{66}$
Esteróis				
Colesterol (Colesta-5-en-3 β -ol)	$27\Delta^5$		386	$\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$
Colestanol (5 α (H)Colestan-3 β -ol)	$27\Delta^0$		388	$\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}$

Brassicasterol (24-metilcolest-5,22-dien-3β-ol)	$28\Delta^{5,22}$		398	$C_{28}H_{46}O$
Campesterol (24-metilcolest-5-en-3β-ol)	$28\Delta^5$		400	$C_{28}H_{48}O$
Estigmasterol (24-etilcolesta-5,22(E)-dien-3β-ol)	$29\Delta^{5,22}$		412	$C_{29}H_{48}O$
Estigmastanol (24-etil-5α(H)-colesta-22-en-3β-ol)	$29\Delta^{22}$		414	$C_{29}H_{50}O$
Sitosterol (24-etilcolesta-5-en-3β-ol)	$29\Delta^5$		414	$C_{29}H_{50}O$
Sitostanol (24-etil-5α(H)-colestan-3β-ol)	$29\Delta^0$		416	$C_{29}H_{52}O$

Esterenos

Estigmastandieno (estigmastan-3,5-dieno)	$29\Delta^{3,5}$		396	$C_{29}H_{48}$
Colestadieno (colesta-3,5-dieno)	$27\Delta^{3,5}$		368	$C_{27}H_{44}$
Colesteno (colest-2-eno)	$27\Delta^2$		370	$C_{27}H_{46}$
Estigmastantrieno (estigmastan-3,5,22-trieno)	$29\Delta^{3,5,22}$		394	$C_{29}H_{46}$

5.1.2. Avaliação semiquantitativa

A análise semiquantitativa para os analitos identificados foi feita a partir da área relativa aos íons selecionados para suas respectivas classes como citado anteriormente. As concentrações foram calculadas utilizando-se padrões internos, de modo que as concentrações para as classes de *n*-alcanos, olefinas, hopanoides, cetonas e esterenos foram calculadas a partir da concentração e área do hexadecano-D₃₄, enquanto as concentrações das classes de esteroides e álcoois foram calculadas pelo decanol-D₂₁.

As concentrações de cada classe são mostradas na **Tabela 9**, em que foram calculadas as respectivas médias para as análises realizadas pelo método convencional, sendo mostradas em um gráfico de contribuição relativa na **Figura 9** juntamente com as análises dos métodos *fast*, onde se observa que para todas as análises realizadas, a classe de álcoois apresentou maior contribuição relativa (%), enquanto a classe de esterenos apresentou menor valor.

Tabela 9. Concentração total (ng g⁻¹) de cada classe de substâncias identificadas no corte do testemunho por GCxGC-TOFMS e *fast*-GCxGC-TOFMS.

Experimento	Classes (ng g ⁻¹)						
	<i>n</i> -Alcanos	Olefinas	Álcoois	Cetonas	Hopanoides	Esteroides	Esterenos
Convencional #1	628	564	7419	1469	65	187	3,1
Convencional #2	744	655	7465	1395	68	174	3,5
Convencional #3	630	606	6514	1494	69	162	3,2
(média)	668	608	7133	1453	67	174	3,3
<i>fast</i> 50;100	971	1103	6295	933	88	179	2,4
<i>fast</i> 50;300	825	1123	5484	954	72	155	2,1
<i>fast</i> 70;100	900	1085	7837	945	66	153	1,7
<i>fast</i> 70;300	937	1221	7831	1034	78	153	2,4
<i>fast</i> 60;200-1	1038	1065	131713	16454	94	1918	2,5
<i>fast</i> 60;200-2	1778	1514	503543	86261	161	12041	5,0
<i>fast</i> 60;200-3	1043	601	6704	1019	138	342	4,2
<i>fast</i> 60;200-4	1789	2417	498970	85662	134	9922	3,0
(média)	1412	1399	285233	47349	132	6131	3,7

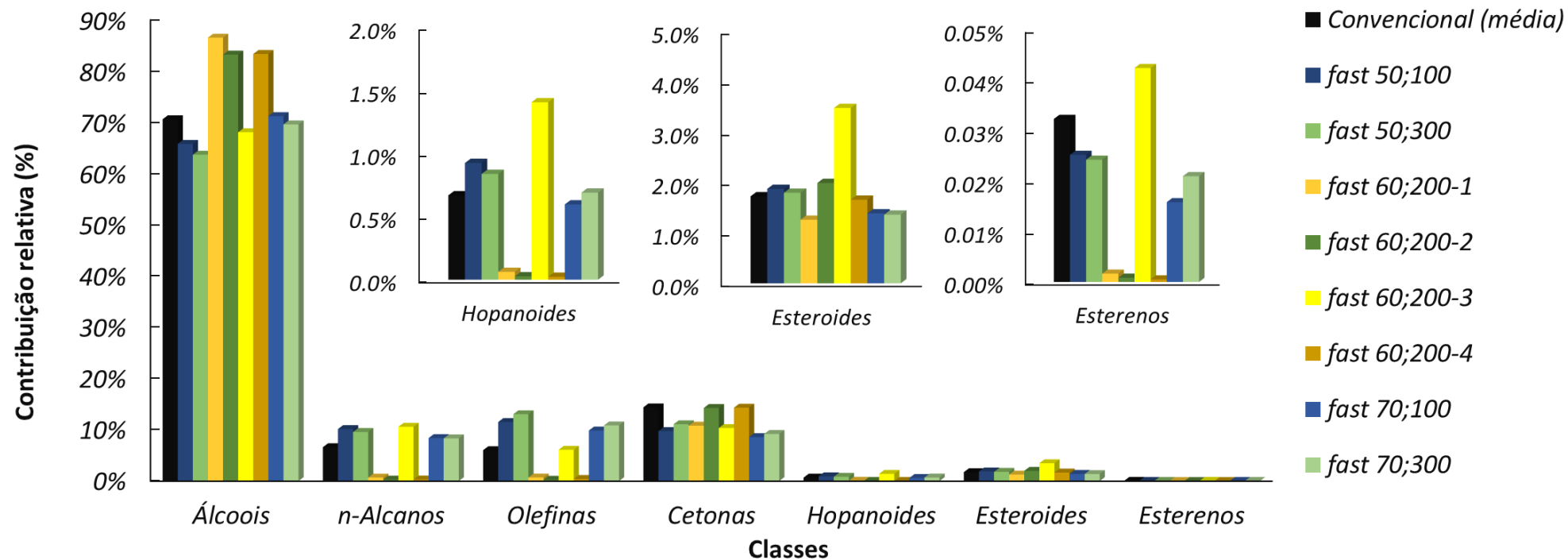


Figura 9. Distribuição em porcentagem de massa relativa das classes de substâncias quantificadas no corte do testemunho analisado por GCxGC-TOFMS e fast-GCxGC-TOFMS.

5.1.3. Avaliação de parâmetros cromatográficos

Como observado na **Figura 10**, alguns compostos que têm a mesma estrutura hidrocarbônica apresentaram valores de tempos de retenção muito próximos, tais como os esteroides colesterol-colestanol, estigmasterol-estigmastanol e sitosterol-sitostanol. Para estes e outros compostos foram calculados os valores de resolução cromatográfica, seletividade e eficiência (**Tabelas 10 e 11**) utilizando-se as equações presentes no tópico **1.3.1** tanto para o método convencional quanto para o método *fast*.

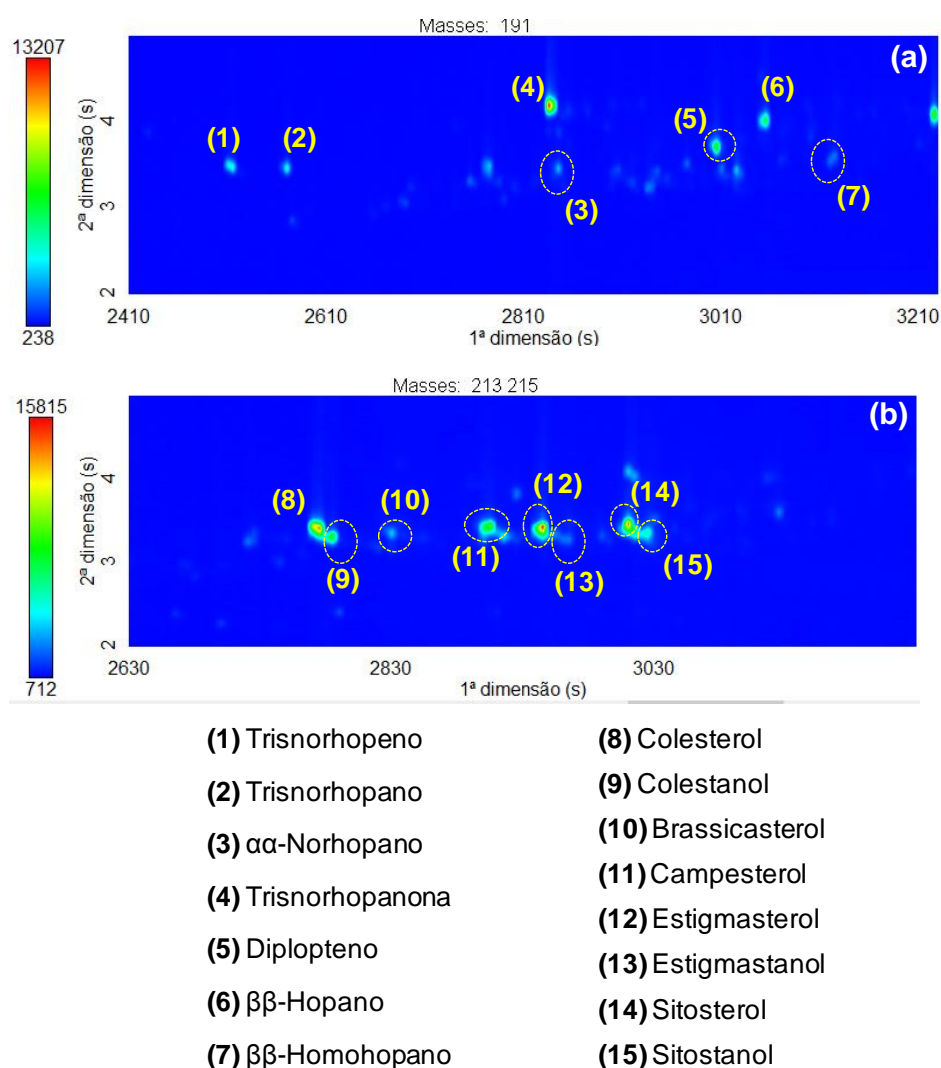


Figura 10. Ampliação dos cromatogramas de íons extraídos via GCxGC-TOFMS da replicata 1, mostrando a região de eluição dos **(a)** hopanóides, m/z 191; **(b)** esteróis, m/z 213 + 215.

Tabela 10. Valores de seletividade (GCxGC α) e resolução cromatográfica (GCxGC R_s) mensurados para os métodos cromatográficos convencional e *fast* (70;300) a partir de pares de analitos selecionados e suas respectivas equações

Pares de compostos	Seletividade (GCxGC α)		Resolução (GCxGC R_s)	
	GCxGC	f-GCxGC	GCxGC	f-GCxGC
Octadecanol-Fitol	1.47	1.44	2.86	1.20
Colesterol-Colestanol	1.44	1.45	0.60	1.30
Estigmasterol-Estigmastanol	1.43	1.41	0.59	0.67
Sitosterol-Sitostanol	1.44	1.44	0.88	0.64
Hexadecano-heptadecano	1.25	1.29	4.69	2.41
Hexadeceno-heptadeceno	1.25	1.28	4.23	2.52
Equações	$\alpha = \frac{t_{R2}}{t_{R1}}$		$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(w_{b2} + w_{b1})/2}$	
	$GC \times GC \alpha = \sqrt{(1^D\alpha)^2 + (2^D\alpha)^2}$		$GC \times GC R_s = \sqrt{(1^DR_s)^2 + (2^DR_s)^2}$	

Tabela 11. Valores de altura do prato teórico (H) mensurados para os métodos cromatográficos convencional e *fast* (70;300) a partir de analitos selecionados e suas equações.

Compostos	Eficiência (H [$\times 10^{-3}$])	
	GCxGC	f-GCxGC
Octadecanol	1.01	0.39
Colesterol	0.05	0.09
Estigmasterol	0.05	0.02
Sitosterol	0.19	0.17
Hexadecano	3.99	1.23
Hexadeceno	1.83	2.78
Equações	$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2$	
	$H = L/N$	

As **Tabelas 10 e 11** apresentam os parâmetros referentes à separação cromatográfica (seletividade, resolução e eficiência) a partir das diferenças de condições experimentais entre os métodos convencional e *fast*, sendo esta principalmente a redução do comprimento da coluna da primeira dimensão de 30 para 10 m.

Para a resolução cromatográfica, GCxGC R_s , observa-se uma diminuição de seus valores para a maior parte dos pares de compostos avaliados, o que já era esperada em função da diminuição evidente do tempo de análise, que passou de 60 para 20 min, entretanto seus valores se mantiveram em níveis adequados ($R_s > 1,5$ – 99% separação; $R_s > 1,0$ – 90% separação) (SHIMADZU, 2022). Em relação à seletividade entre os pares de compostos analisados, não houve diferenças observadas para seus valores quando comparados entre os métodos, estando todos acima de 1.

A eficiência (**N**) foi avaliada a partir da mensuração do número de pratos teóricos (**N**) para cada uma das substâncias listadas, sendo inversamente proporcional à altura de um prato teórico (**H**), de modo que quanto menor o valor de **H**, melhor a separação cromatográfica. Desta forma, observa-se que em alguns casos, os valores obtidos pelo método *fast* e pelo método convencional sofreram pouca alteração, enquanto em outros casos (octadecanol, estigmasterol, hexadecano e heptadeceno) a altura do prato teórico teve seu valor diminuído no método *fast*, desta forma o método ofereceu melhor separação.

Apesar de ter apresentado reduções nos valores da resolução cromatográfica, o método *fast* não gerou dificuldades para a identificação de compostos com tempos de retenção muito próximos, considerando que a seletividade permaneceu praticamente constante e acima de 1, sendo assim a eficiência do método cromatográfico proposto apresentou-se como satisfatória para boa parte dos analitos, proporcionando um menor tempo de análise e bons valores de resolução cromatográfica.

5.2. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

5.2.1. Intervalo de confiança: análise convencional (GCxGC-TOFMS)

A avaliação estatística do método convencional a um nível de significância de 95% permitiu a obtenção do intervalo de confiança para a concentração total de cada classe e também dos valores p para as classes em função da concentração individual de seus respectivos analitos por meio de análise de variância, como mostrado na **Tabela 12**.

Tabela 12. Resumo estatístico de cada classe de substâncias identificadas no sedimento superficial analisado por GCxGC-TOFMS.

Experimento	n- Alcanos	Concentração total das classes identificadas (ng g ⁻¹)					
		Olefinas	Álcoois	Cetonas	Hopanoídes	Esteroides	Esterenos
Convencional #1	628	564	7419	1469	65	187	3,1
Convencional #2	744	655	7465	1395	68	174	3,5
Convencional #3	630	606	6514	1494	69	162	3,2
Média (m)	668	608	7133	1453	67	174	3,3
Desvio Padrão (s)	66	46	536	51	1,9	12	0,2
Desvio padrão relativo (DPR%)	10%	7%	8%	4%	3%	7%	6%
Intervalo de Confiança (95%)	165	113	1332	128	4,8	31	0,49
Valor p	0,72	0,88	0,95	0,99	0,99	0,83	0,99

Os resultados mostram que os valores **p** determinados para cada classe estão todos acima do nível de significância de 0,05, desta forma, a hipótese nula é aceita, indicando que as análises são estatisticamente equivalentes. A utilização da ferramenta *Estatística Descritiva* no Excel permitiu obter o valor do desvio padrão para a concentração total de classe, a partir do qual foi possível calcular o desvio padrão relativo (DPR%) a partir da equação abaixo:

Equação 16. Desvio padrão relativo (%)

$$DPR(\%) = \frac{s}{m} * 100$$

Segundo Ribani *et al.* (2007), são aceitos valores de DPR % de até 20% para análises em matrizes complexas, desta forma, para o método convencional aplicado à amostra foram

obtidos ótimos valores de desvio padrão relativo (DPR %), sendo iguais ou inferiores a 10%, para cada uma das classes de substâncias identificadas.

5.2.2. Análise de variância (ANOVA: 1 fator): *fast* x convencional

Os resultados de concentração dos analitos de cada classe foram submetidos a análise de variância (ANOVA: 1 fator) considerando valor de $\alpha = 0,05$ (95% de confiança) a partir da ferramenta Análise de Dados do Excel. O estudo foi realizado comparando-se as 3 replicatas do método convencional com cada método *fast* separadamente para cada classe, considerando-se a concentração cada um de seus analitos como variável resposta, obtendo-se assim seus respectivos valores de $F_{\text{crítico}}$ e $F_{\text{calculado}}$, como mostrados na **Tabela 13**.

Tabela 13. Valores de $F_{\text{calculado}}$ e $F_{\text{crítico}}$ para cada classe obtidos por ANOVA: 1 fator para o comparativo entre os métodos *fast* e convencional.

Experimento	<i>n</i> -Alcanos	Olefinas	Álcoois	Cetonas	Hopanoídes	Esteroides	Esterenos
<i>fast</i> 50;100	1,3	1,9	0,1	0,4	0,4	0,1	0,1
<i>fast</i> 50;300	0,5	1,5	0,2	0,3	0,03	0,9	0,9
<i>fast</i> 60;200-1	1,3	1,0	6,1	3,8	0,4	10	0,06
<i>fast</i> 60;200-2	9,0	3,1	7,2	4,9	2,0	28	0,02
<i>fast</i> 60;200-3	1,7	0,1	0,04	0,2	2,6	3,9	0,6
<i>fast</i> 60;200-4	5,4	4,5	7,6	3,9	1,5	31	0,01
<i>fast</i> 70;100	1,1	0,5	0,1	0,3	0,01	0,2	0,2
<i>fast</i> 70;300	1,3	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	1,0
$F_{\text{crítico}}$	2,7	2,9	2,7	2,7	2,8	2,9	3,2

O comparativo de contribuições em massa relativa das análises realizadas pelo método *fast* com o método convencional (mostrado no tópico 5.1.2) resultou em perfis semelhantes, mantendo-se a classe de álcoois como mais abundantes e as e esterenos como as menos abundantes. Entretanto, com a realização da Análise de Variância (ANOVA) a 95% de confiança utilizando as concentrações dos analitos de cada classe como variável resposta, foi observado que algumas classes apresentaram valores de $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$ quando analisadas em determinadas condições (destacados em **negrito**). Nesses casos há rejeição da hipótese nula (H_0). Dito isso, apenas os métodos *fast* realizadas nas condições de 50 eV com 100 e 300 espectros s^{-1} e 70 eV com 100 e 300 espectros s^{-1} foram estatisticamente equivalentes ao método convencional para todas as

classes, aceitando a hipótese nula (H_0), enquanto as análises realizadas na condição de 60 eV e 200 espectros s^{-1} rejeitaram a hipótese nula (H_0) para algumas classes, não sendo estatisticamente equivalentes ao método convencional para a quantificação dos hidrocarbonetos.

5.2.3. Gráfico de Pareto e superfície de resposta: *fast-GC*×*GC-TOFMS*

Para o planejamento fatorial do tipo 2^2 com réplicas no ponto central utilizado, foi utilizado como variável resposta a relação sinal/ruído (S/N) das substâncias em função de seus íons diagnósticos (1), seus íons moleculares (2) e da razão entre (2)/(1), com a avaliação das classes de biomarcadores: esteroides (m/z 213 + 215) e hopanoides (m/z 191). As relações sinal/ruído foram obtidas em cada um dos experimentos *fast* e computadas no *software Chemoface*, onde foram inseridas à função de desejabilidade a fim de se reestruturar todos os dados em uma nova variável resposta para a construção dos gráficos de Pareto e de superfícies de resposta.

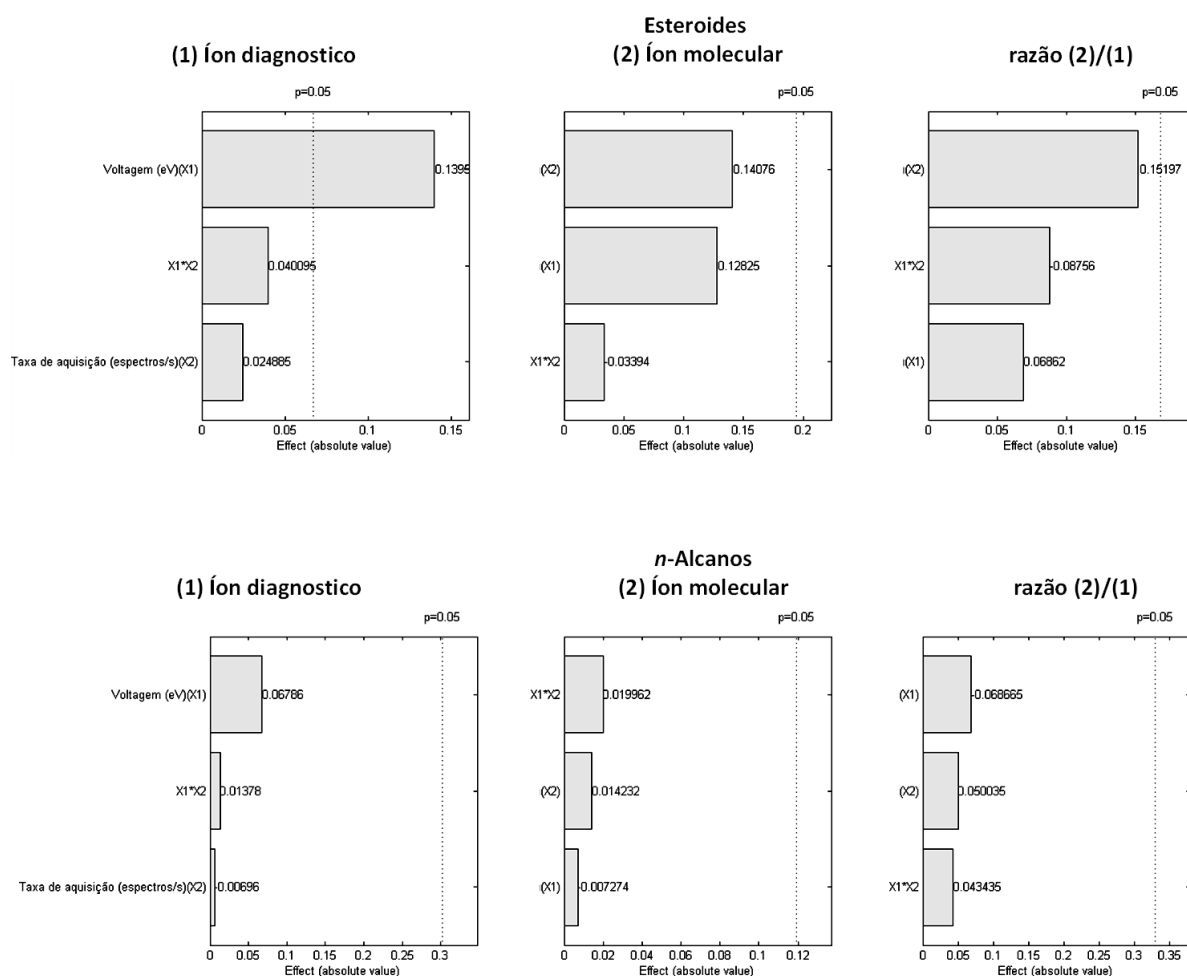


Figura 11. Gráficos de Pareto mostrando efeitos das variáveis sobre a resposta de esteroides e *n*-alcanos.

A partir da **Figura 11** é possível ter uma visualização clara dos efeitos de cada fator, analisado: voltagem da fonte de ionização (X_1) e taxa de aquisição (X_2); além do efeito do fator de interação de segunda ordem dado pelo produto entre os efeitos principais (X_1X_2). Observa-se que a maioria dos fatores apresentaram significância abaixo de $p=0,05$, não sendo, portanto, estatisticamente significativos. Desta forma não influenciam de maneira positiva ou negativa para a relação sinal/ruído dos analitos. Com isso, observa-se que somente para a avaliação da relação sinal/ruído do íon diagnóstico dos esteroides a variável X_1 (voltagem da fonte de ionização) foi significativa a um nível de significância de 95% e com tendência positiva, já para os *n*-alcanos tanto as variáveis X_1 e X_2 , quanto sua interação X_1X_2 não foram significativas. As classes de hopanoides, esterenos, cetonas, olefinas e alcoois seguiram a mesma tendência da classe de *n*-alcanos, podendo ser observadas no **Apêndice D**.

Após a avaliação das variáveis a partir dos gráficos de Pareto, foram construídos gráficos de superfície de resposta usando um modelo linear de interação (**Figura 12**) com o objetivo de se estabelecer as melhores condições analíticas. Como visto anteriormente, somente a voltagem da fonte de ionização foi estatisticamente significativa para a avaliação da relação sinal/ruído de esteroides tendo como fonte o íon diagnóstico, desta forma ao se observar os gráficos da **Figura 12**, nota-se que há uma resposta para melhores valores de S/N em condições experimentais de 70 eV e 300 espectros s^{-1} , o mesmo pode ser observado para as demais fontes de relação sinal/ruído avaliadas (íon molecular e razão) e para a classe de hopanoides. Os demais gráficos podem ser observados no **Apêndice F**.

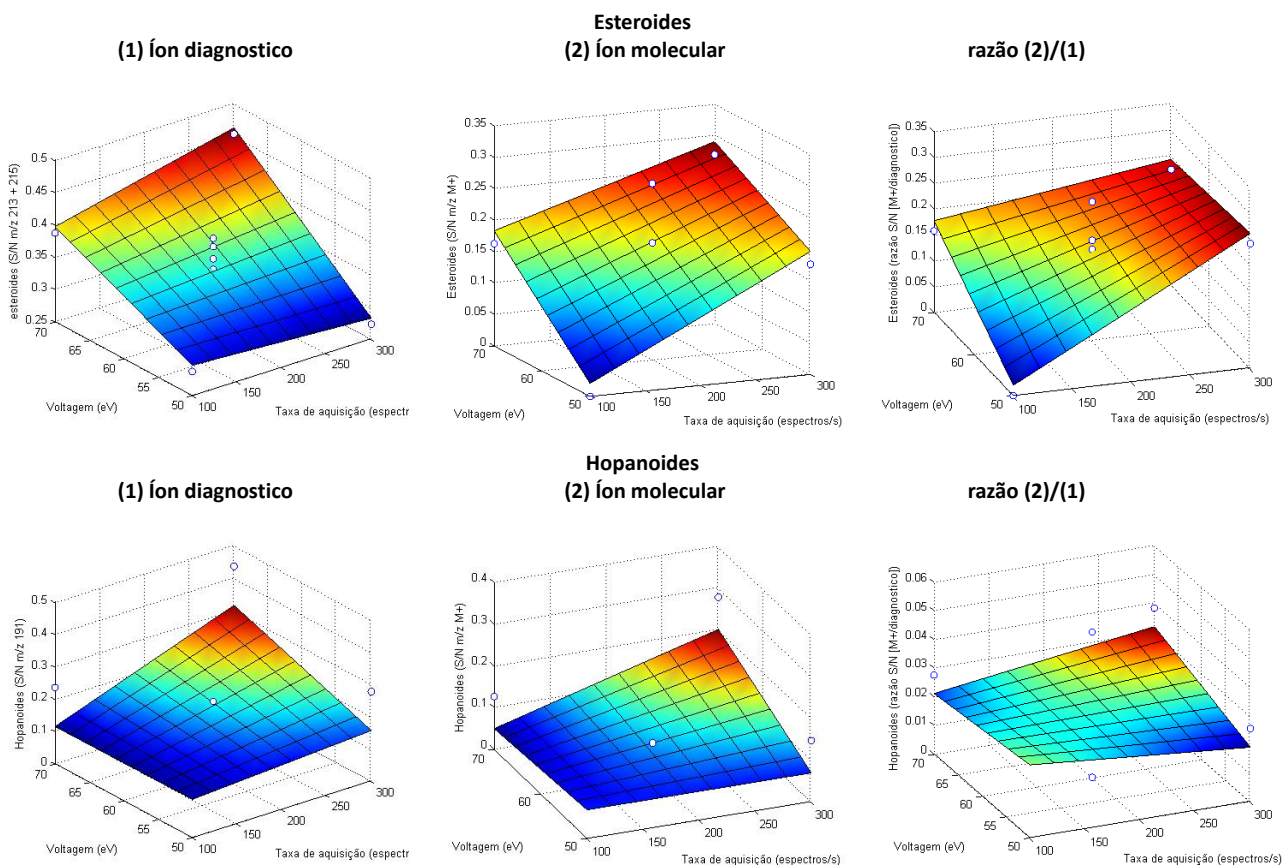


Figura 12. Superfície de resposta para voltagem da fonte de ionização (eV) vs.taxa de aquisição (espectros s^{-1}) para as classe de esteróides e hopanoides.

Os dados estatísticos para a construção da superfície de resposta referente aos íons diagnósticos dos esteroides são mostrados na **tabela 14** abaixo, a partir da qual se observa que o modelo linear de interação aplicado apresentou um valor de coeficiente de determinação (R^2) elevado ($\sim 90\%$), além disso o comparativo entre os valores de F obtidos com os valores tabelados indicam boa adequabilidade do modelo para a relação sinal/ruído dos íons diagnósticos, de modo que como $F > F_{\text{tabelado}}$ para a razão entre $MS_{\text{regressão}}/MS_{\text{resíduos}}$ há rejeição da hipótese nula (H_0), sendo assim a variância dos dados é descrita pela regressão. Já para a razão $MS_{\text{falta de ajuste}}/MS_{\text{erro puro}}$ o valor de $F < F_{\text{tabelado}}$, desta forma a hipótese nula é aceita, o que implica que a grande parte da variância dos dados é relacionada ao experimento, e não a falta de ajuste do modelo.

Tabela 14. Parâmetros estatísticos para o modelo linear de interação relacionados à voltagem da fonte de ionização (X_1) e à taxa de aquisição (X_2) para a relação sinal/ruído dos íons diagnósticos da classe de esteroides.

	b	erro	t	p	significativo
b_0 ($X=1$)	0,1562	0,1434	1,0897	0,3555	não
Voltagem (X_1)	0,003	0,0024	1,2566	0,2978	não
Taxa de aquisição (X_2)	-0,0011	6,42E-04	-1,6797	0,1916	não
$X_1 \times X_2$	2,00E-05	1,06E-05	1,8993	0,1537	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0,0217	3	0,0072	13,9534	0,0138
Resíduos	0,0021	4	5,18E-04		
Falta de ajuste	7,36E-04	1	7,36E-04	1,6505	0,2891
Erro puro	0,0013	3	4,46E-04		
Total	0,0238	7			
R^2	0,9128		$F_{tab} (3;4)$	6,59	
R^2 ajustado	0,8474		$F_{tab} (1;3)$	10,13	

SS = soma quadrática; DF = graus de liberdade; MS = média quadrática.

O estudo também permitiu a avaliação da amostra como um todo, selecionando-se uma substância de cada classe para a obtenção do gráfico de Pareto e superfície de resposta: trisnorhopeno, colesterol, estigmastadieno, hexadecano, hexadeceno, cosanona e heptadecanol. As relações sinal/ruído para os analitos em questão foram obtidas em cada um dos experimentos *fast* e computadas no *software Chemoface*, onde foram inseridas à função de desejabilidade a fim de se reestruturar todos os dados em uma nova variável resposta para a construção dos gráficos de Pareto e de superfícies de resposta, como mostrados na **Figura 13**.

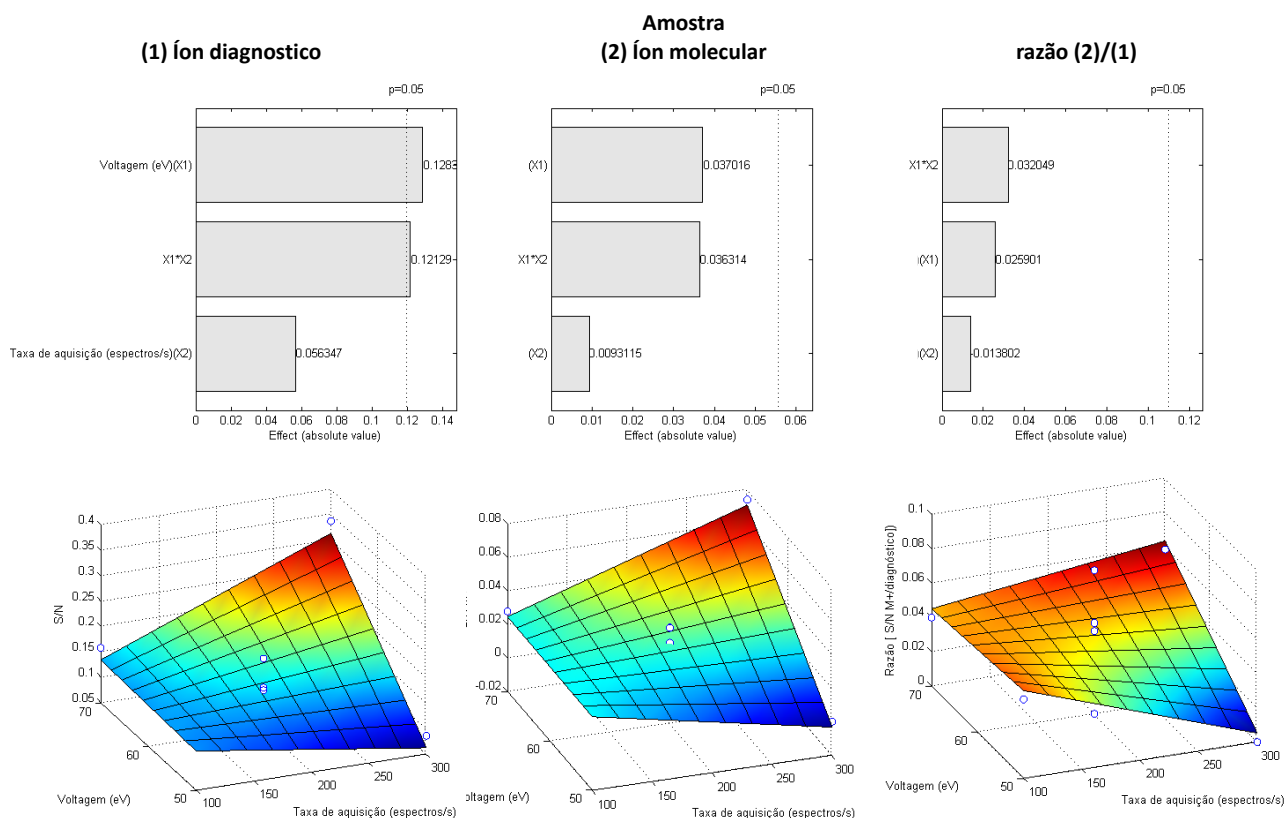


Figura 13. Gráficos de Pareto e superfície de resposta obtido para a variável resposta relação sinal-ruído obtida para os íons diagnósticos e íons moleculares para os analitos selecionados de cada classe.

A partir dos gráficos de Pareto mostrados na **Figura 13** é possível ter uma visualização clara dos efeitos de cada fator, sendo eles os efeitos dos dois fatores analisados: voltagem da fonte de ionização (X_1) e taxa de aquisição (X_2); além do efeito do fator de interação de segunda ordem dado pelo produto entre os efeitos principais (X_1X_2). A partir dos gráficos de Pareto, observa-se significância estatística apenas para avaliação da relação S/N dos íon diagnósticos, em que houve significância estatística para os efeitos da voltagem da fonte de ionização e de interação de segunda ordem. Em contrapartida, tanto para a avaliação da relação sinal/ruído dos íons moleculares quanto para a razão, nenhum dos 3 fatores foram significativos.

A observação da inclinação das superfícies de resposta mostradas em ambas as figuras permite obter uma indicação da condição experimental cuja relação sinal/ruído apresenta melhores valores, condizendo com o experimento realizado a uma taxa de aquisição de $300 \text{ espectros s}^{-1}$ em conjunto com uma voltagem da fonte de ionização de 70 eV, o que também foi observado na avaliação individual das classes.

Os resultados estatísticos para o modelo linear de interação são mostrados na **tabela 15**, indicando uma razoável adequabilidade para a avaliação da relação sinal/ruído dos íons moleculares como variável-resposta, uma vez que para esse estudo foi obtido o valor de R^2 aceitável (0,797).

Tabela 15. Parâmetros estatísticos para o modelo linear de interação relacionados à voltagem da fonte de ionização (X_1) e à taxa de aquisição (X_2) para a relação sinal/ruído dos íons diagnósticos da classe de esteroides.

	b	erro	t	p	significativo
$b_0(X=1)$	0,4453	0,2543	1,7512	0,1782	não
Voltagem (X_1)	-0,0057	0,0042	-1,3651	0,2656	não
Taxa de aquisição (X_2)	-0,0034	0,0011	-2,9481	0,0601	não
X_1X_2	6,06E-05	1,87E-05	3,2396	0,0479	sim
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0,0343	3	0,0114	5,2478	0,0715
Resíduos	0,0087	4	0,0022		
Falta de ajuste	0,0045	1	0,0045	3,2256	0,1704
Erro puro	0,0042	3	0,0014		
Total	0,0431	7			
R^2	0,7974		$F_{tab} (3;4)$	6,59	
R^2 ajustado	0,6455		$F_{tab} (1;3)$	10,13	

SS = soma quadrática; DF = graus de liberdade; MS = média quadrática.

A observação dos valores de F obtidos também indicam boa adequabilidade do modelo linear de interação para a relação sinal-ruído dos íons moleculares, para a razão $MS_{falta\ de\ ajuste}/MS_{erro\ puro}$ o valor de $F < F_{critico}$, desta forma a hipótese nula é aceita, o que implica que a grande parte da variância dos dados é relacionada ao experimento, e não a falta de ajuste do modelo.

A utilização do *software Chemoface* permitiu o estudo das relações sinal/ruído dos íons diagnósticos e moleculares de diferentes substâncias obtidas em cada método *fast* pelo método da superfície de resposta com a utilização da função de desejabilidade, indicando que a condição experimental para a obtenção da melhor relação sinal/ruído do íon diagnóstico da classe de esteróides condiz com o método de 70 eV com 300 espectros s^{-1} , promovendo um íon mais significativo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação da técnica GC×GC-TOFMS para o estudo da caracterização de um sedimento superda Lagoa das Garças pertencente ao Parque Nacional da Reserva de Jurubatiba - RJ, permitiu a identificação e quantificação de substâncias das classes de hopanoides, esteroides, esterenos, olefinas, álcoois, cetonas e *n*-alcanos juntamente com a avaliação de dois métodos: convencional com coluna de primeira dimensão de 30 m; e *fast* com uma coluna de primeira dimensão de 10 m.

A quantificação das substâncias de cada uma das classes supracitadas por meio do método convencional realizada em triplicata mostrou que a classe mais abundante foi a de álcoois correspondendo a cerca de 70% em massa de todos os analitos identificados, seguido das classes de cetonas e olefinas. Além disso, foram obtidos os intervalos de confiança (95% de confiabilidade) para cada uma das classes, juntamente com os valores de desvio padrão relativo inferiores a 10%, indicando boa repetibilidade do método em questão.

Os parâmetros seletividade, eficiência e resolução cromatográficas aferidos permitiram observar que houve diminuição da resolução nas análises *fast*-GC×GC em relação ao método cromatográfico convencional para alguns casos, entretanto, essa diminuição não impactou na identificação dos compostos, uma vez que seletividade obtida foi maior que 1 para todos os casos, além da obtenção de melhores valores de eficiência para mais da metade dos analitos avaliados, indicando que o método *fast*-GC×GC desenvolvido é adequado para análise de componentes orgânicos em sedimentos e pode ser aplicado em estudos de geoquímica orgânica ambiental.

A união dos resultados das análises de variância (ANOVA: 1 fator), que utilizou as concentrações das substâncias como variável resposta, com os resultados do método das superfícies de resposta, que teve como variável resposta a relação sinal/ruído dos íons moleculares, permite concluir que o método *fast* nas condições de 70 eV e 300 espectros s⁻¹ proporciona uma melhor identificação das substâncias e seus respectivos íons diagnósticos juntamente com uma maior equivalência estatística ao método convencional em relação às concentrações obtidas para cada composto.

7. CONCLUSÕES

A análise de variância das concentrações das classes mostrou que o método em questão possui equivalência estatística, com 95% de confiança, ao método convencional a nível de concentração, apresentando ainda bons valores de resolução cromatográfica, eficiência e seletividade. Desta forma, o método *fast* otimizado, cujo tempo de análise é de 20 min, permitiu a identificação e quantificação das substâncias das classes: hopanoides, esteroides, esterenos, *n*-alcanos, olefinas, álcoois e cetonas; presentes em uma amostra ambiental complexa, com uma maior confiabilidade analítica, sendo, portanto, adequado para estudos de geoquímica orgânica molecular em matrizes ambientais como sedimentos.

Além disso, o método *fast*-GC×GC-TOFMS desenvolvido para análise de amostras de sedimentos foi otimizado por um planejamento fatorial 2^2 com ponto central para melhorar a sensibilidade de íons diagnósticos e moleculares de biomarcadores orgânicos. As análises estatísticas por meio de gráficos de superfície de resposta e de Pareto indicaram que houve melhora na relação sinal/ruído de íons diagnósticos em condições experimentais de 70 eV e 300 espectros s^{-1} , principalmente para a classe de esteroides, para a qual houve maior significância da variável voltagem fonte de ionização. Os gráficos também indicaram melhores relações sinal/ruído para íons moleculares e para as demais classes nas mesmas condições experimentais.

REFERÊNCIAS

- ADAHCHOUR, M., BEENS, J., VREULS, R. J. J., BRINKMAN, U. A. Th. Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC), 1, Introduction and instrumental set-up, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 438-454, **2006**.
- ADAHCHOUR, M., TAŞÖZ, A., BEENS, J., VREULS, R. J. J., BATENBURG, A. M., BRINKMAN, U. A. Th. Fast comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) using 50-µm ID second-dimension columns. **Journal of Separation Science**, v. 23, p. 753-760, **2003**.
- ÁVILA, B. M. F. **Especiação de hidrocarbonetos saturados e compostos sulfurados em amostras petroquímicas por cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo**, Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, **2014**.
- CARAMASCHI, E. P., SANCHEZ-BOTERO, J. I., HOLLANDA-CARVALHO, P., BRANDÃO, C. A. S., SOARES, C. L., NOVAES, J. L. C., BARTOLETTE, R. *Peixes das Lagoas costeiras do norte fluminense: estudos de caso*. Em: C. F. D. ROCHA, F. A., ESTEVES e F. R. SCARANO, Eds, **Pesquisas de longa duração na Restinga de Jurubatiba – Ecologia, história natural e conservação**, RiMa, São Carlos, p. 310-312, **2004**.
- CECCOPIERI, M., CARREIRA, R. S., WAGENER, A. L., HEFTER, J. H., MOLLENHAUER, G. On the application of alkenone- and GDGT-based temperature proxies in the south-eastern Brazilian continental margin. **Organic Geochemistry**, v. 126, p. 43-56, **2018**.
- CHRISTENSEN, R., Analysis of variance, design and regression – Applied statistical methods. CRC: Nova Iorque, p. 41-74, **2000**.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA), **Biomass – Estágios sucessionais da vegetação de restinga**. Resolução CONAMA nº 261/1999.
- DA SILVA, L. S. V. **Aplicação do uso de biomarcadores em estudo paleo ambiental do Lago Mar Chiquita, Argentina**. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro, **2007**.
- DAY, J. W. J., YÁÑEZ-ARANCÍBA, A. Coastal lagoons and estuaries, ecosystem approach. **Ciência Interamericana**, 22 (1-2), p. 11-26, **1982**.
- DUBOIS, L. M., PERRAULT, K. A., STEFANUTO, P. H., KOSCHINSKI, S., EDWARDS, M., MCGREGOR, L., FOCANT, J. F. Thermal desorption comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to variable-energy electron ionization time-of-flight mass spectrometry for monitoring subtle changes in volatile organic compound profiles of human blood. **Journal of Chromatography A**, v. 1501, p. 117-127, **2017**.
- ENRICH-PRAST, A., BOZELLI, R. L., ESTEVES, F. A., MEIRELLES, F. P., *Lagoas costeiras da Restinga de Jurubatiba: Descrição de suas variáveis limnológicas em: Pesquisas de longa duração na Restinga de Jurubatiba – Ecologia, história natural e conservação* (C. F. D. ROCHA, F. A. ESTEVES e F. R. SCARANO, Eds), RiMa, São Carlos, 245-253), **2004**.
- EGLINTON, G., CALVIN, M. Chemical Fossils, **Scientific American**, v. 261, p.32-43, **1967**.

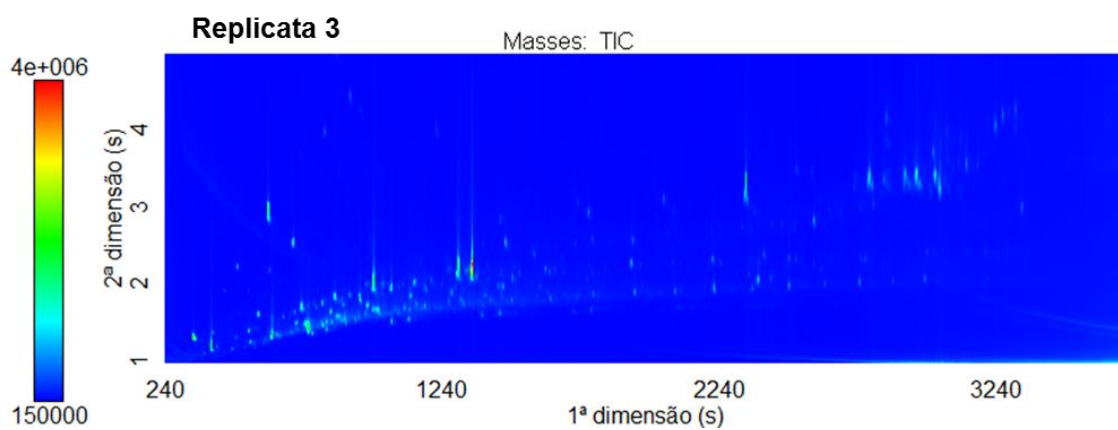
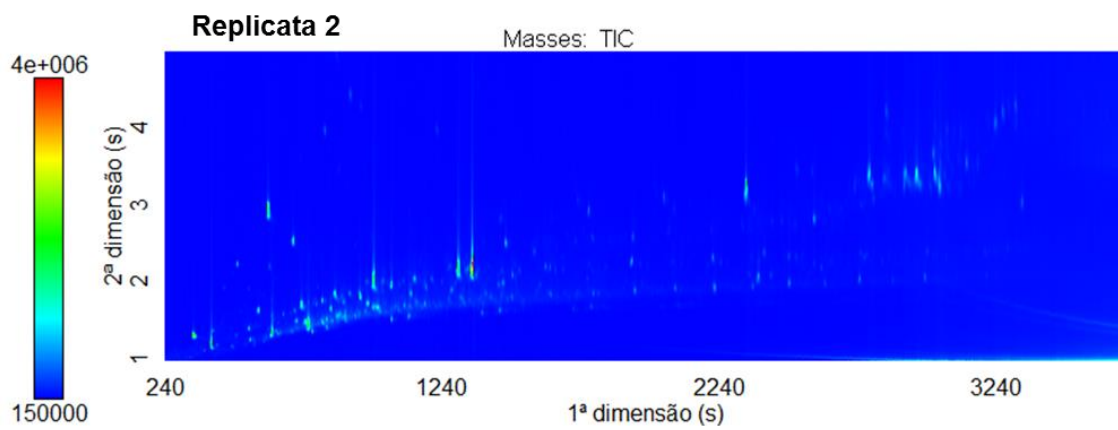
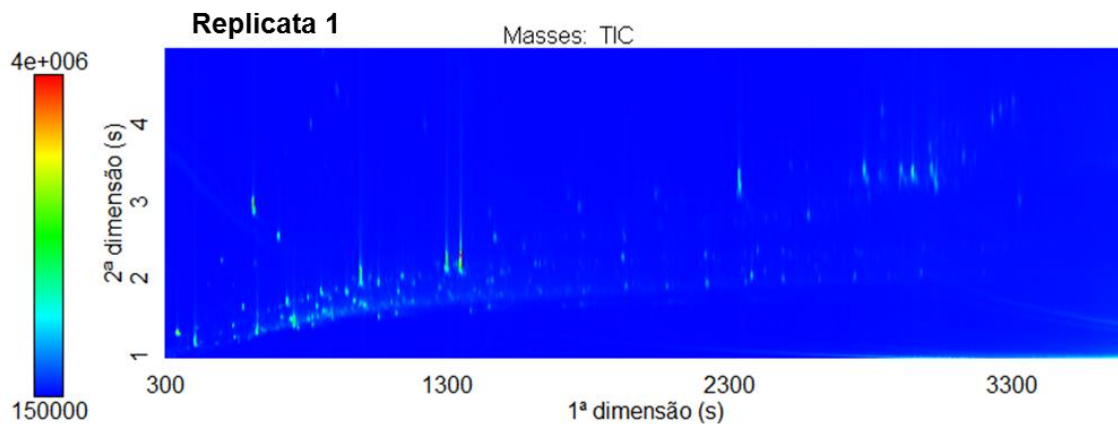
- ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. 2ª ed, Rio de Janeiro: Interciência, p. 11-22, **1998**.
- FARRAPEIRA, R. O., ANDRADE, Y. B., SCHENA, T., SCHENEIDER, J. K., MUHLEN, C., BJERK, T. R., KRAUSE, L. C., CAMARÃO, E. B. Characterization by fast-GC×GC-TOFMS of the acidic/basic/neutral fractions of bio-oils from pyrolysis from fast pyrolysis of green coconut fibers. **Industrial & Engingeering Chemistry Research**, **2022**.
- FRANÇA, D. S., COUTINHO, D. M., BARRA, T. A., XAVIER, R. S., AZEVEDO, D. A. Molecular-level characterization of Brazilian pre-salt crude oils by advanced analytical techniques. **Fuel**, 293, 120474, **2021**.
- PEREIRA FILHO, E. R., **Planejamento Fatorial em Química – maximizando a obtenção de resultados**; UFSCar, **2015**.
- FOLHARINI, S. O., OLIVEIRA, R. C., FURTADO, A. L. S. **Unidades geoambientais do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, litoral norte fluminense**. Revista do Departamento de Geografia, Universidade de São Paulo (USP), vol. 39, **2020**.
- GODOY, J. M., Datação de sedimentos com ^{210}Pb : resgate do histórico da poluição ambiental no antropoceno. **Revista Virtual de Química**, vol. 10, nº 6, **2018**.
- GONÇALVES, F. T. T., **Caracterização geoquímica e paleoambiental do Cretáceo Inferior da bacia de Camamu, Bahia**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, **1997**.
- GONÇALVES, F. T. T. **Controles limnológicos sobre a formação de rochas geradoras de petróleo lacustres: o exemplo da Bacia de Camamu, Nordeste do Brasil**. UNESP, Geociências, v. 20, n.1, p. 5-23, **2001**.
- HARVEY, H. R., Sources and cycling of organic matter in the marine water column, **Marine Organic Matter: Biomarkers, Isotopes and DNA**, v. 2N, p. 1-25, **2006**.
- HOBBIE, J. E. Ed, **Estuarine Science – a synthetic approach to research and practice**. Covelo: Island Pressed, **2000**.
- ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, **Plano de manejo do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba**, **2007**.
- LAPPONI, J. C. **Estatística usando Excel**. Elsevier, Rio de Janeiro, **2005**.
- LANÇAS, F. M., McNAIR, H. M. Cromatografia gasosa 1. Teoria elementar. **Química Nova**, **1983**.
- LOPES, A. A., PEREIRA, V. B., AMORA-NOGUEIRA, L., MAROTTA, H., MOREIRA, L. S., CORDEIRO, R. C., VANINI, G., AZEVEDO, D. A. Hydrocarbon sedimentary organic matter composition from different water-type floodplain lakes in the Brazilian Amazon, **Organic Geochemistry**, v. 159, **2021**.
- MARTINS, J. M. A. **Caracterização da matéria orgânica particulada na transição Baía de Guanabara-oceano costeiro usando marcadores isotópicos e moleculares**. Tese de Doutorado, PUC-Rio, **2017**.
- MILLER, J. N., MILLER, J. C. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. Pearson, 6ª edição, **2010**.

- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E., Como fazer experimentos: **pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Editora Unicamp, 2ª edição, p. 85-100 e 251-264, **2001**.
- NUNES, C. A., FREITAS, M. P., PINHEIRO, A. C. M., BASTOS, S. C. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 23, n. 1, p. 2003-2012, **2012**.
- PEREIRA, V. B. **Biogeoquímica molecular da matéria orgânica em testemunho do Lago Jacundá, Amazônia Brasileira**. Dissertação de mestrado, UFRJ, **2021**.
- RAMOS, L., BRINKMAN, U. A. Th. *Multidimensionality in gas chromatography: general concepts* em: **Comprehensive analytical chemistry: comprehensive two-dimensional gas chromatography**. Wilson & Wilson, v. 55, p. 3-14, **2009**.
- RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. A. F., MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 0, **2004**.
- SANZ, J. *Theoretical considerations*. Em: **Comprehensive analytical chemistry: comprehensive two-dimensional gas chromatography**. Wilson & Wilson, v. 55, p. 64-74, **2009**.
- SCHENA, T., BJERK, T. R., von MÜHLEN, C., CAMARÃO, E. B. Influence of acquisition rate on performance of fast comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry for coconut fiber oil characterization. **Talanta**, v. 219, p. 121-186, **2020**.
- SCHENA, T., von MÜHLEN, C., MAZZA, F., MAGNELI, L. Fast-GCxGC Applied To Target And Non-Target Analysis Of Environmental Samples. 19th **GCxGC Symposium**. **2022**.
- SEMARD, G., ADAHCHOUR, M., FOCAN, J. F. *Basic instrumentation for GCxGC*. Em: **Comprehensive analytical chemistry: comprehensive two-dimensional gas chromatography**. Wilson & Wilson, v. 55, p. 38-40, **2009**.
- SEQUINEL, R., HATANAKA, R. R., GUALTIERI, C. E., FLUMIGNAN, L., OLIVEIRA, J. E. **cromatografia gasosa ultrarrápida: uma visão geral sobre parâmetros, instrumentação e aplicações**. **Química Nova**, v. 33, n° 10, p. 2226-2232, **2010**.
- SHIMADZU. **Sobre a resolução: parte 1**. Disponível em: <www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/resol-1.html> Acesso em: 30 de jul. de 2022.
- SILVA, T, R., LOPES, S. R. P., SPÖRL, G., KNOPPERS, B. A., AZEVEDO, D. A. Source characterization using molecular distribution and stable carbon isotopic composition of *n*-alkanes in sediment cores from the tropical Mundaú-Mangaratiba estuarine-lagoon system, Brazil. **Organic Geochemistry**, v. 53, p.25-33, **2012**.
- TEÓFILO, R. F., FERREIRA, M. M. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, **2006**.
- VIEIRA, S. Estatística para a qualidade. 2ª edição, Elsevier, **2012**.

WAKEHAM, S., CANUEL, E. Degradation and preservation of organic matter in marine sediments. **Marine Organic Matter: Biomarkers, Isotopes and DNA**, v. 2, p. 295-321, **2005**.

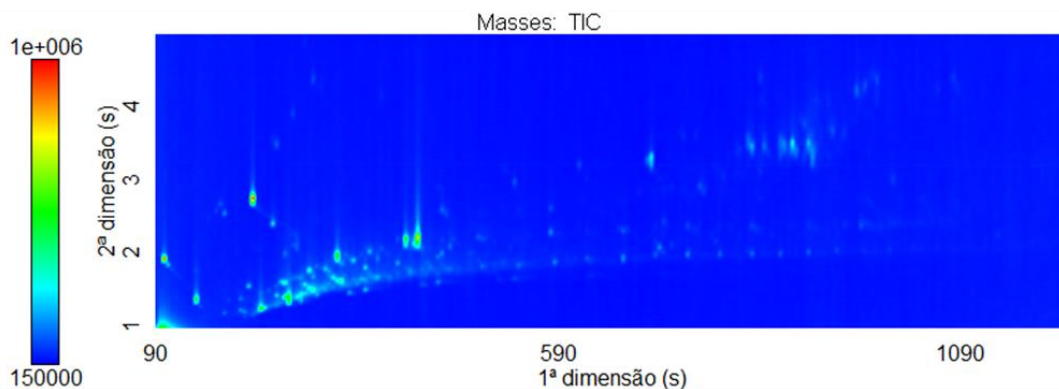
APÊNDICE

A. Cromatogramas obtidos por GC×GC-TOFMS no método convencional,

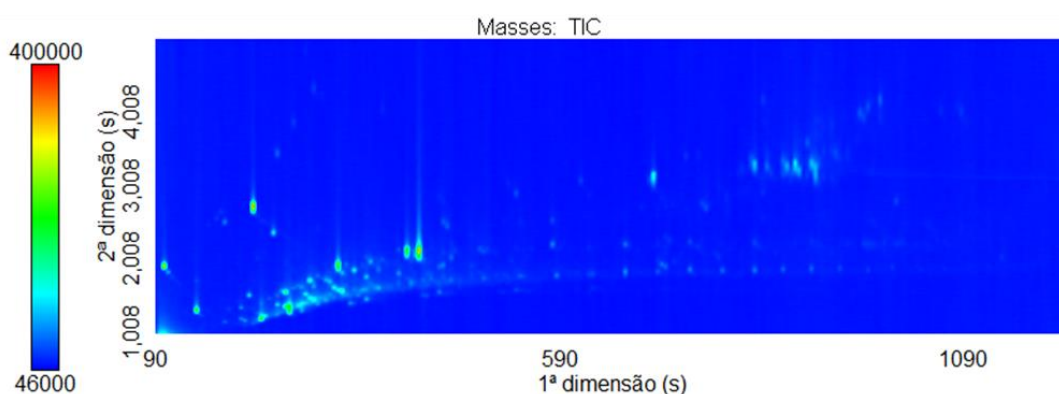


B. Cromatogramas obtidos por *fast*-GCxGC-TOFMS,

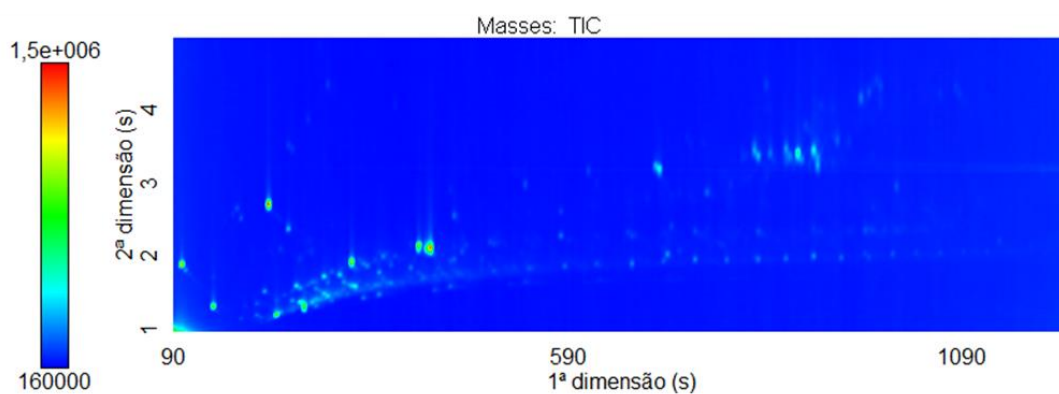
50 eV - 100 espectros/s



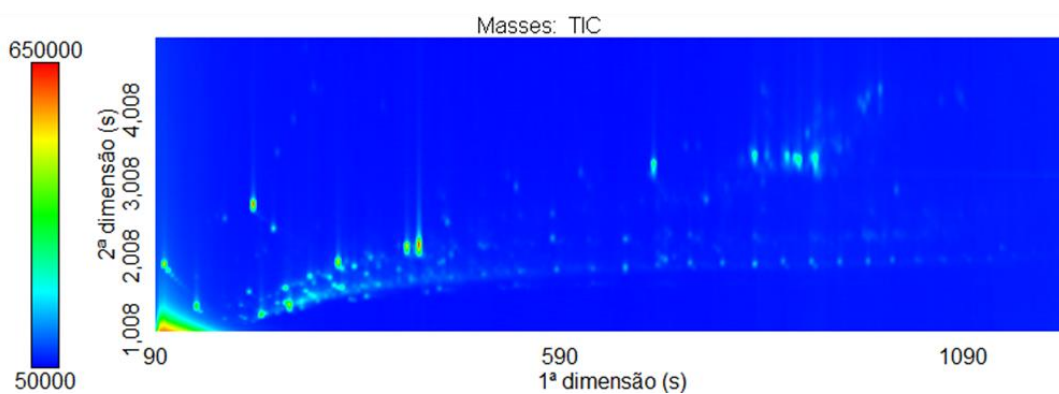
50 eV - 300 espectros/s



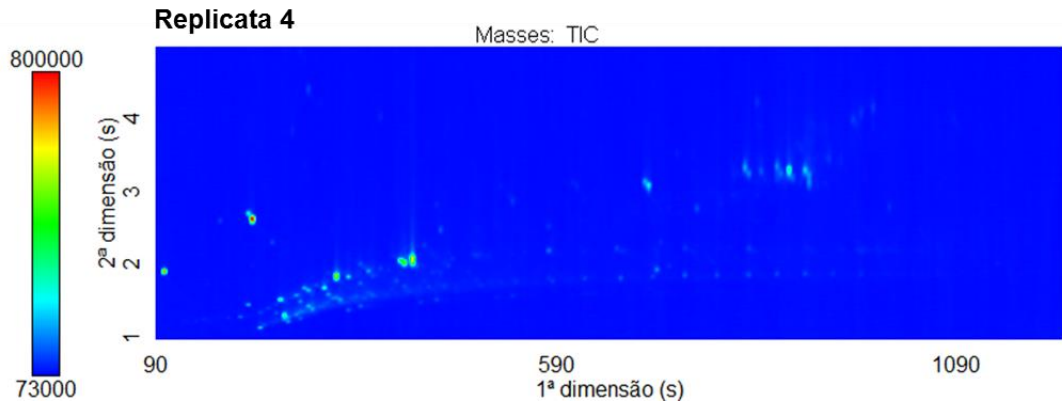
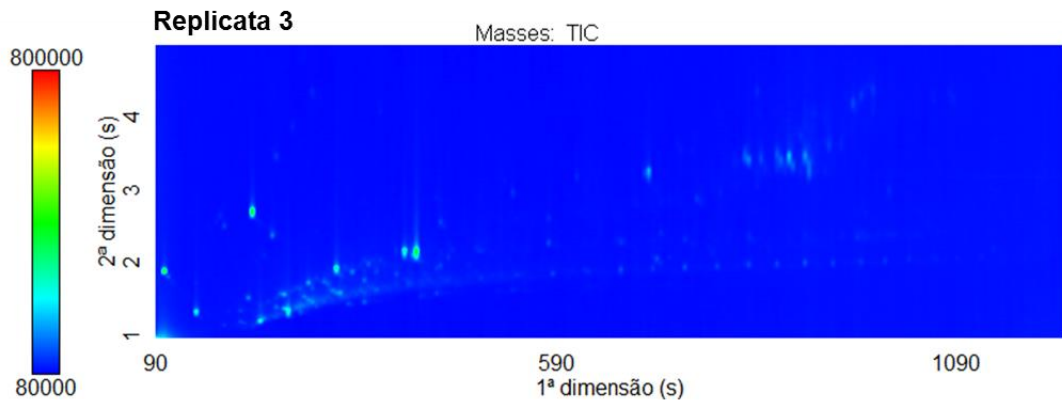
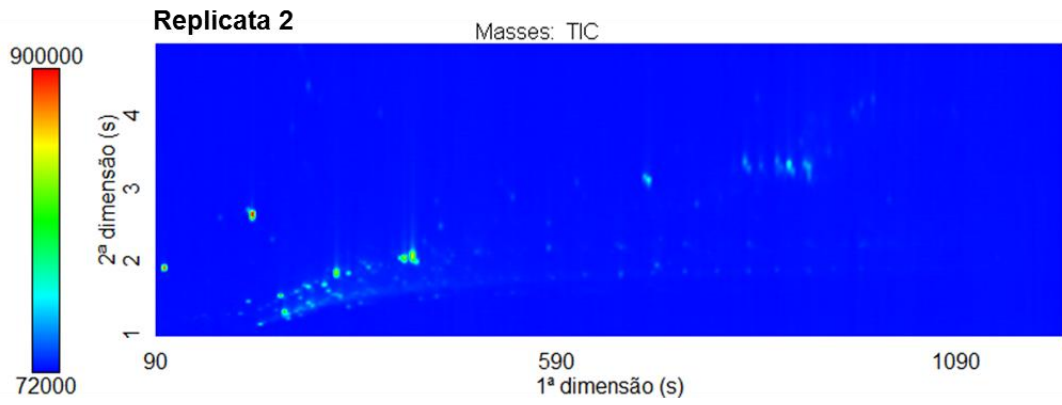
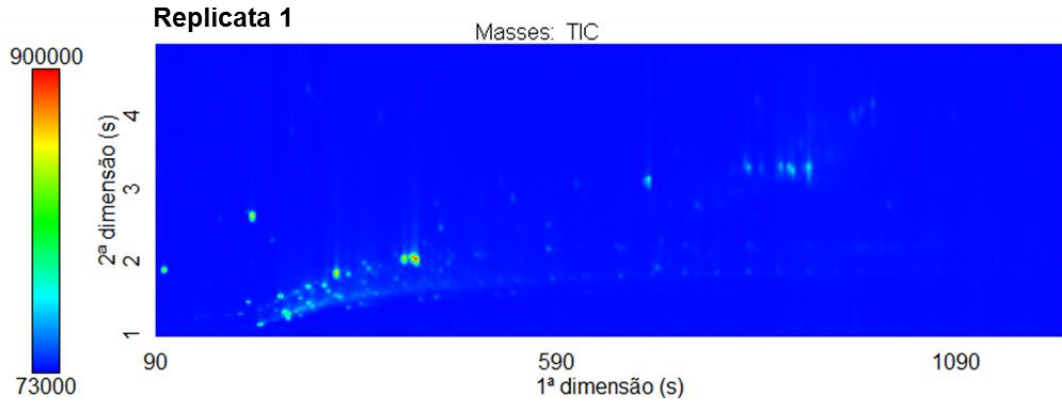
70 eV - 100 espectros/s



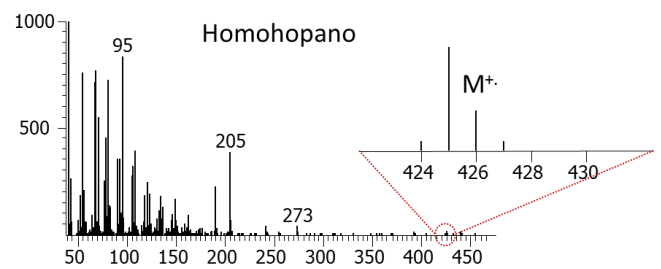
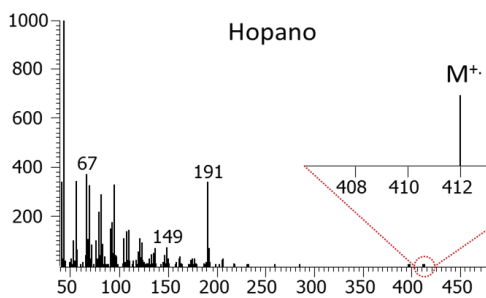
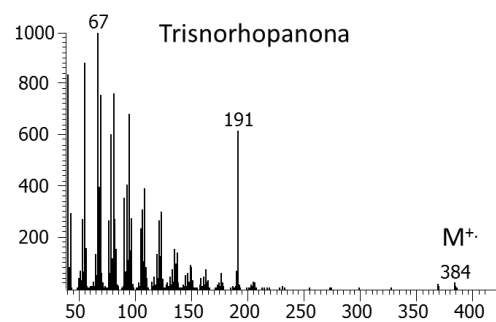
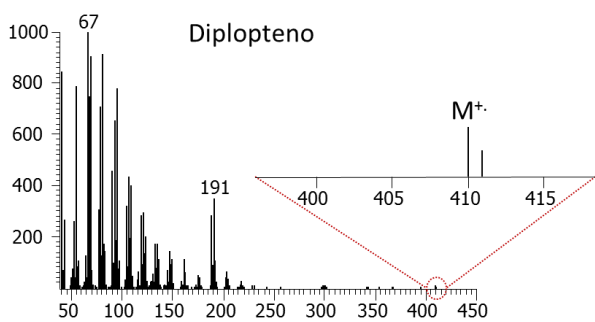
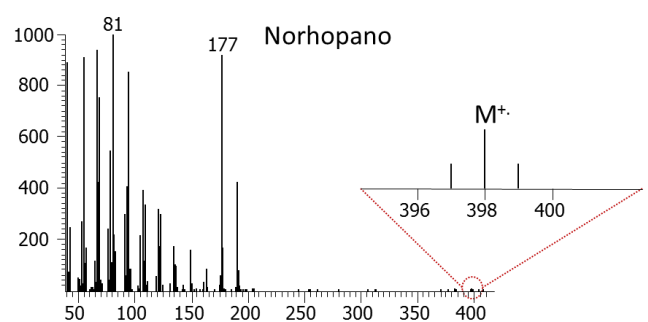
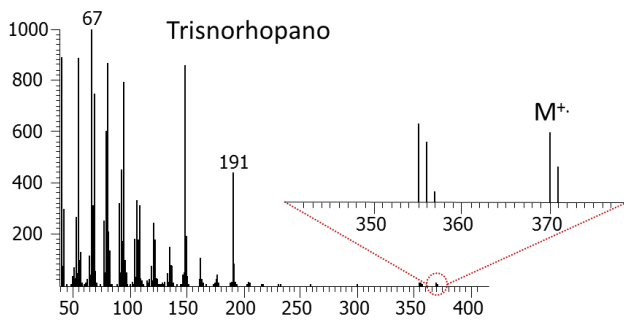
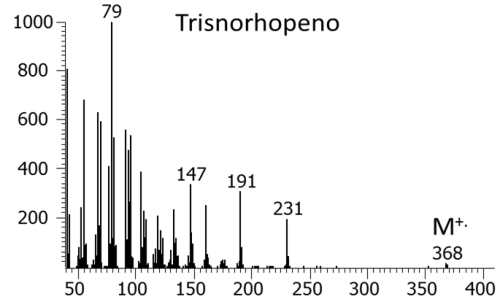
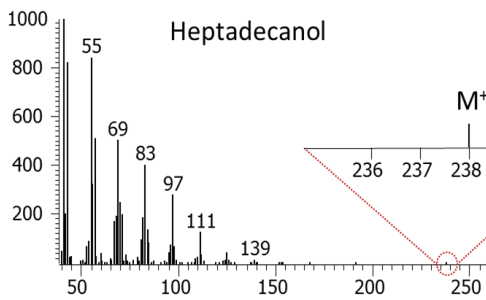
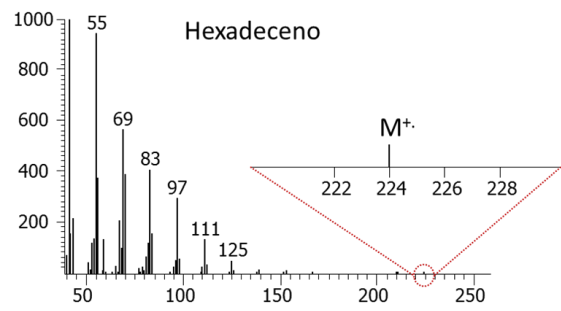
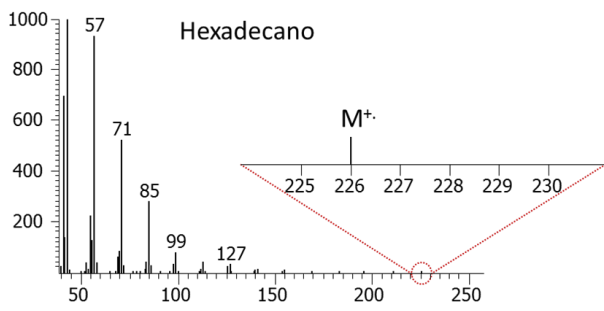
70 eV - 300 espectros/s

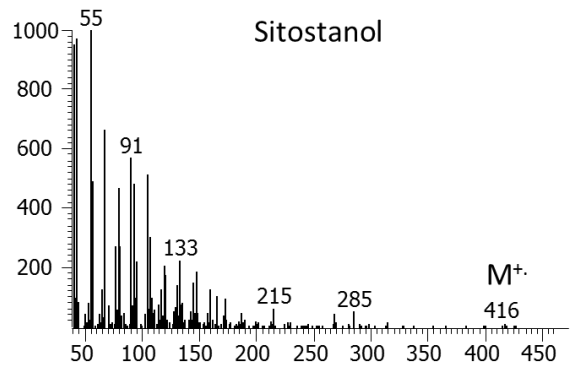
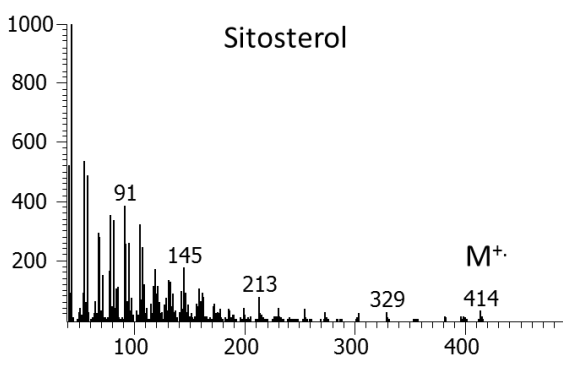
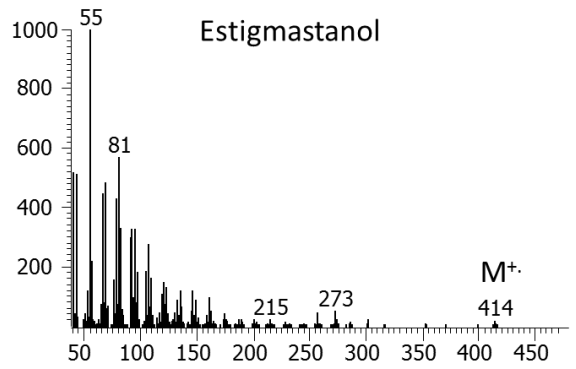
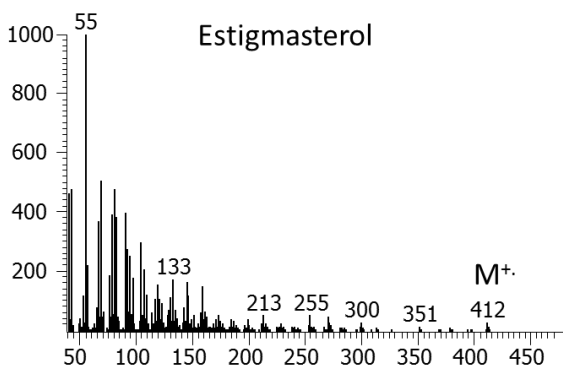
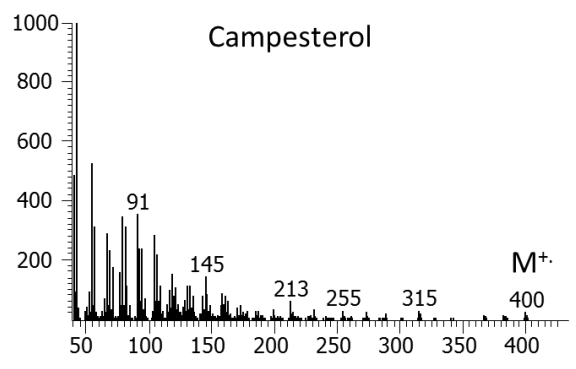
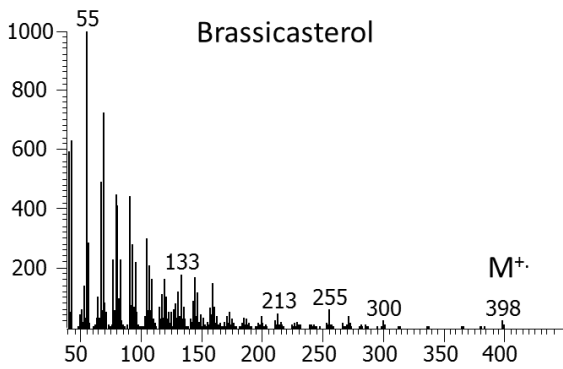
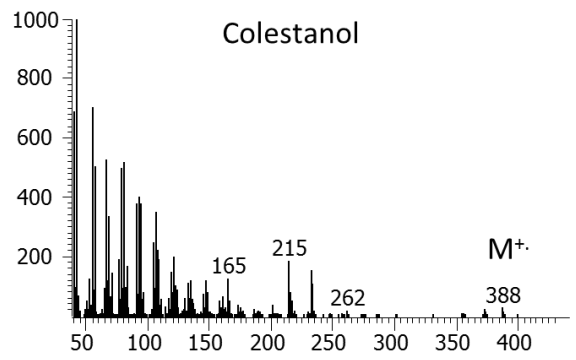
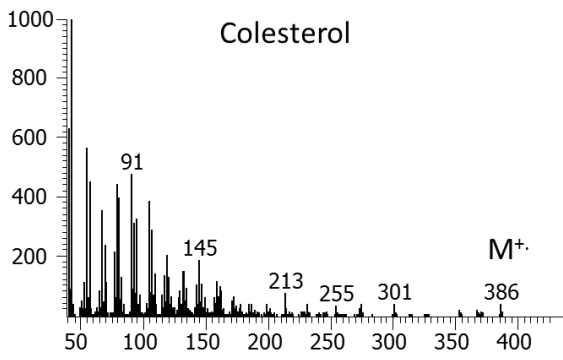


60 eV - 200 espectros/s



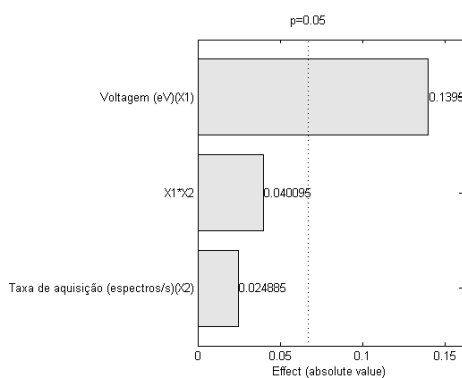
C. Espectros de massas



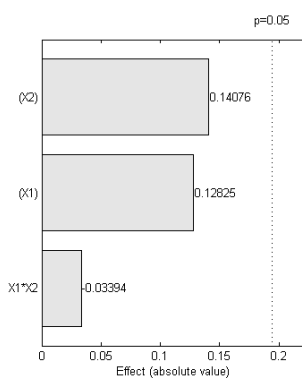


D. Gráficos de Pareto de cada classe

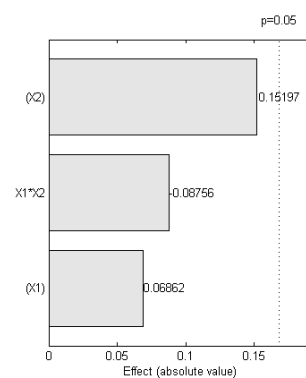
(1) Íon diagnóstico



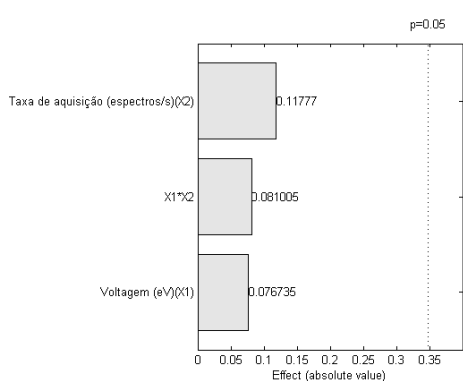
Esteroides
(2) Íon molecular



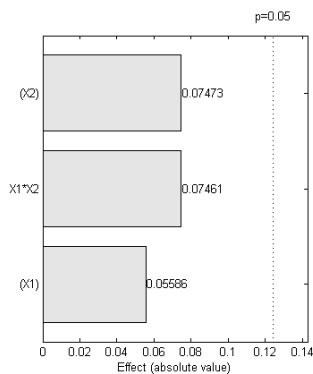
razão (2)/(1)



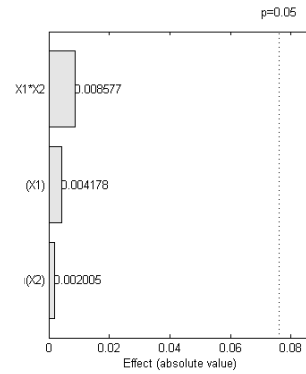
(1) Íon diagnóstico



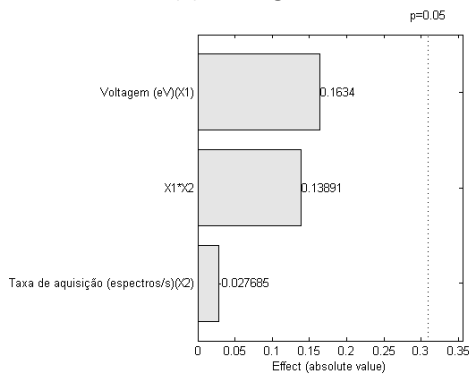
Hopanoides
(2) Íon molecular



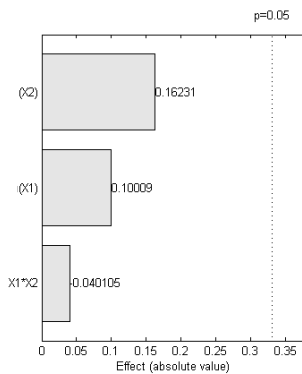
razão (2)/(1)



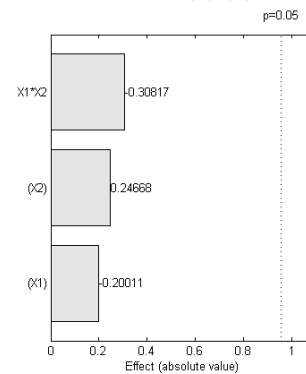
(1) Íon diagnóstico



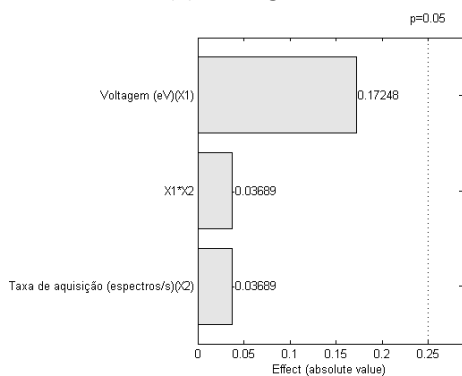
Esterenos
(2) Íon molecular



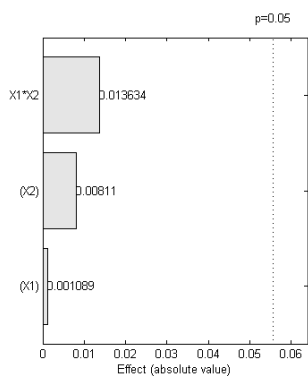
razão (2)/(1)



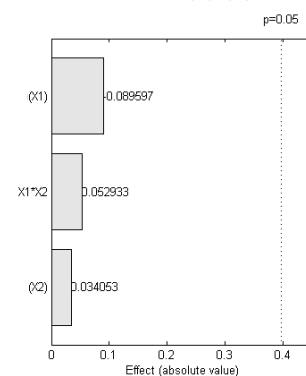
(1) Íon diagnóstico



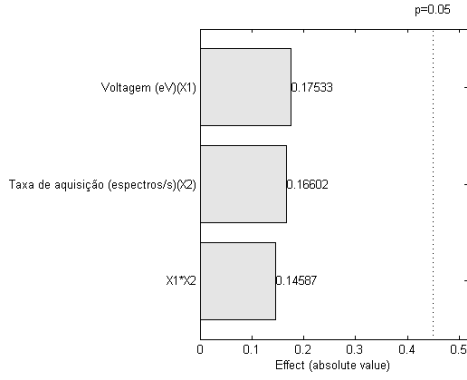
Álcoois
(2) Íon molecular



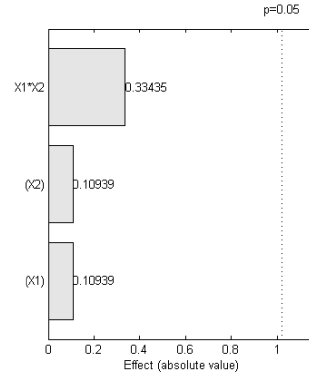
razão (2)/(1)



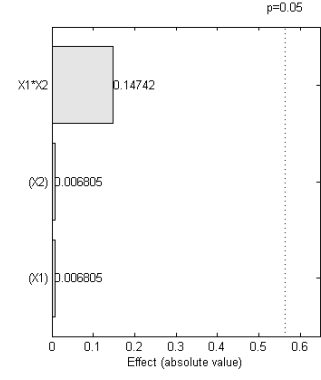
(1) Íon diagnóstico



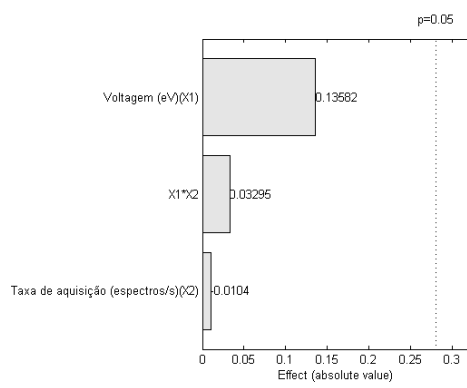
**Cetonas
(2) Íon molecular**



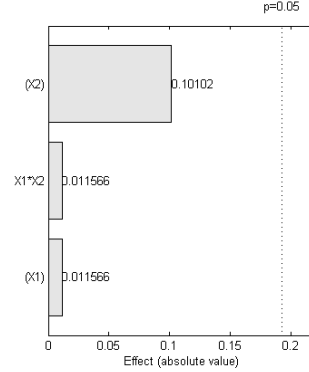
razão (2)/(1)



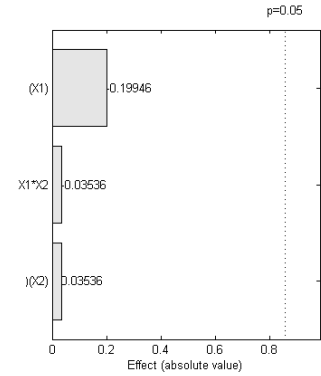
(1) Íon diagnóstico



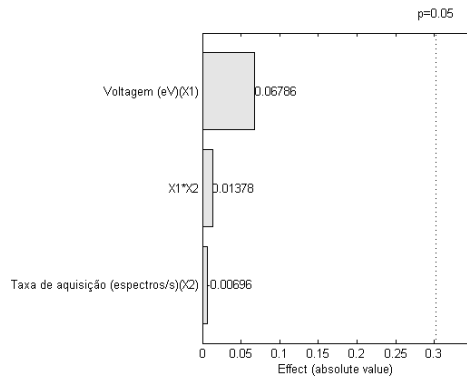
**Olefinas
(2) Íon molecular**



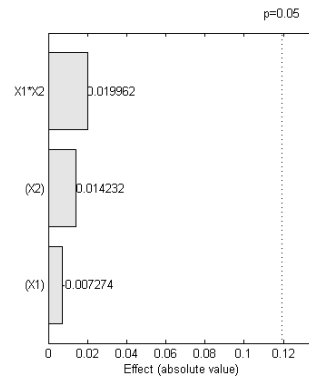
razão (2)/(1)



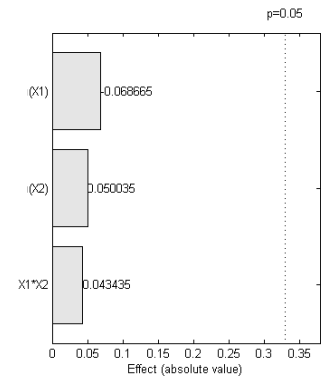
(1) Íon diagnóstico



**n-Alcanos
(2) Íon molecular**

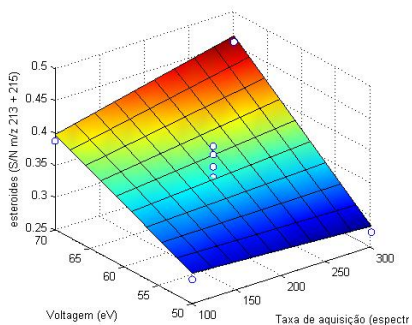


razão (2)/(1)

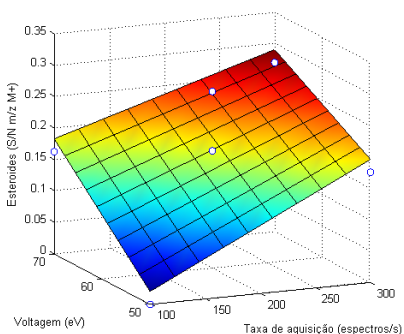


E. Superfícies de resposta de cada classe

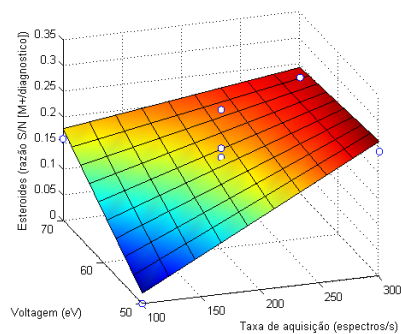
(1) íon diagnóstico



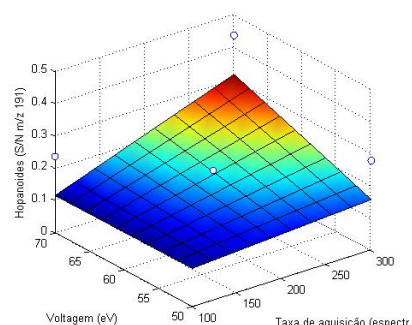
Esteroides
(2) íon molecular



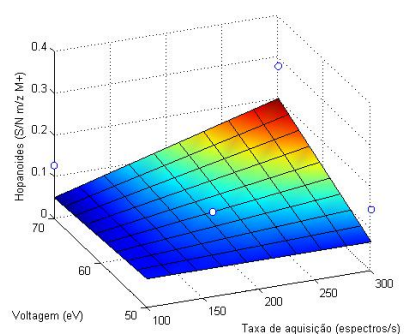
razão (2)/(1)



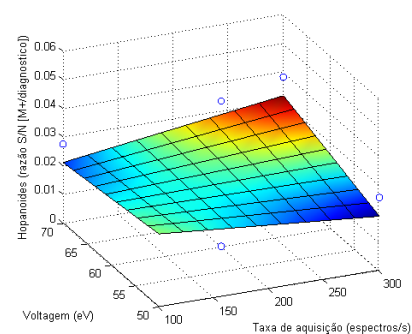
(1) íon diagnóstico



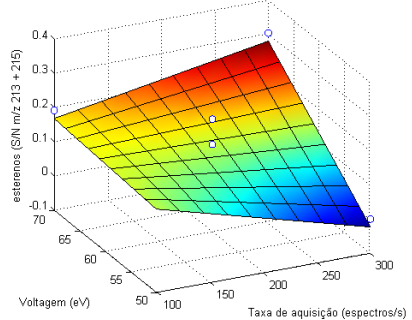
Hopanoides
(2) íon molecular



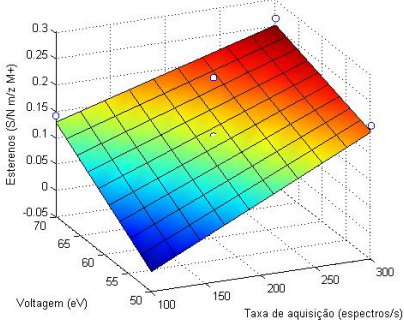
razão (2)/(1)



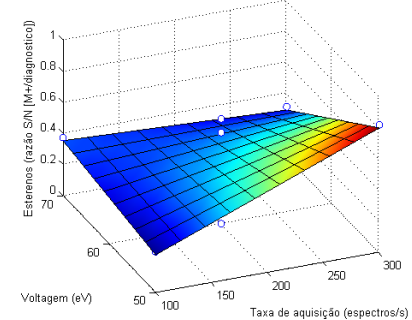
(1) íon diagnóstico



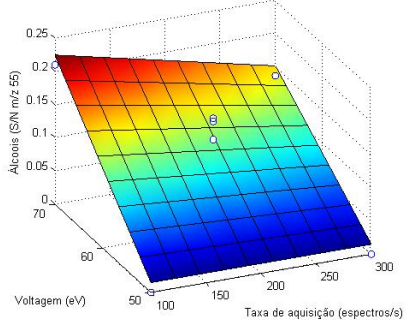
Esterenos
(2) íon molecular



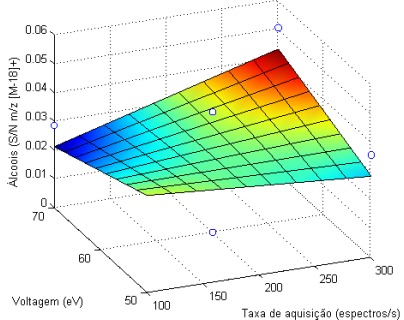
razão (2)/(1)



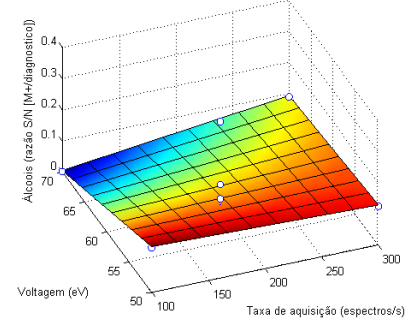
(1) íon diagnóstico



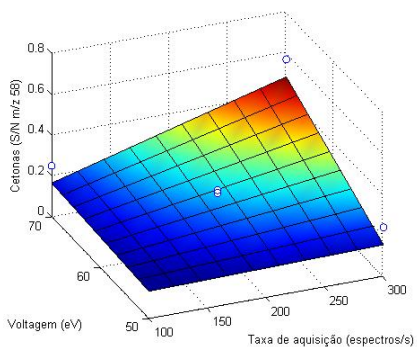
Alcoois
(2) íon molecular



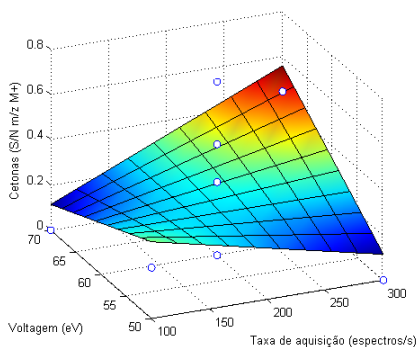
razão (2)/(1)



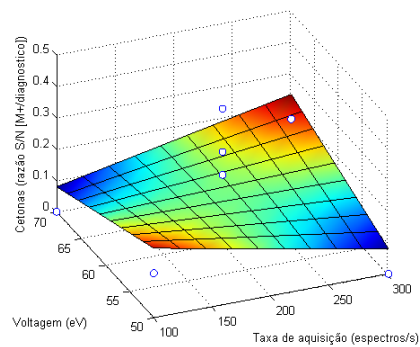
(1) Íon diagnóstico



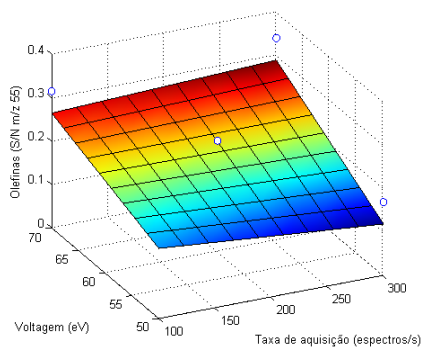
**Cetonas
(2) Íon molecular**



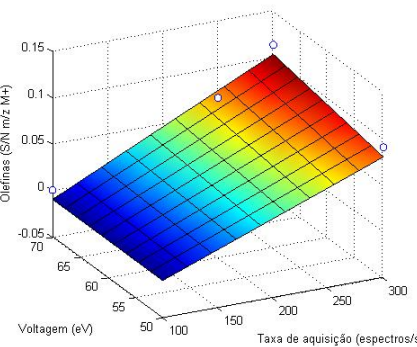
razão (2)/(1)



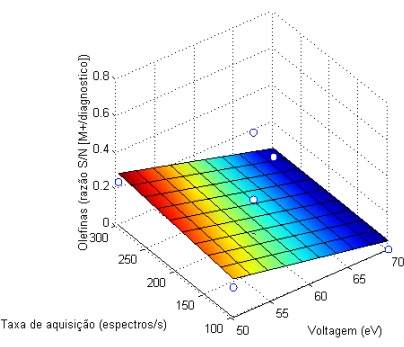
(1) Íon diagnóstico



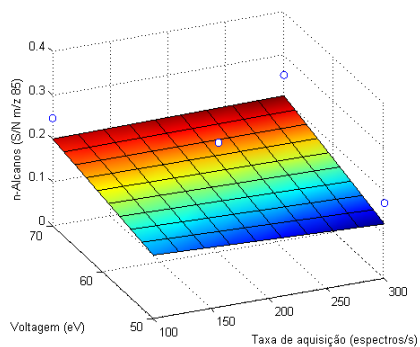
**Olefinas
(2) Íon molecular**



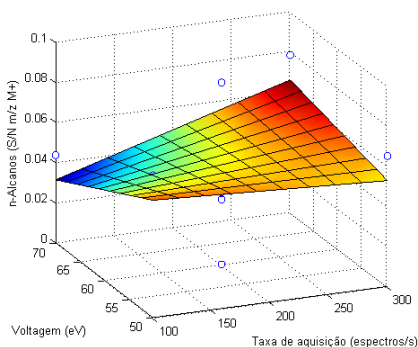
razão (2)/(1)



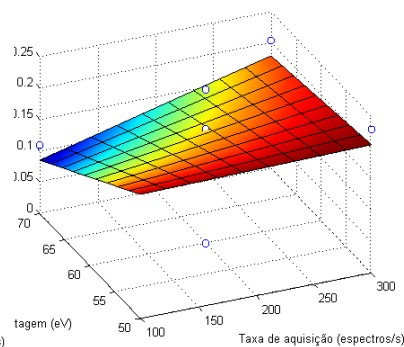
(1) Íon diagnóstico



**n-Alcanos
(2) Íon molecular**



razão (2)/(1)



F. Detalhamento estatístico

Hopanoídes

(1) íon diagnóstico: Coeficientes do Modelo

	b	erro	t	p	significante
b0(X=1)	0.313	0.7411	0.4223	0.7013	não
Voltagem (eV)(X1)	-0.0043	0.0122	-0.3495	0.7498	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	-0.0018	0.0033	-0.5548	0.6177	não
X1*X2	4.05E-05	5.46E-05	0.7423	0.5117	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0.0263	3	0.0088	0.2315	0.8704
Resíduos	0.1516	4	0.0379		
Falta de ajuste	0.1159	1	0.1159	9.7313	0.0525
Erro puro	0.0357	3	0.0119		
Total	0.1779	7			
R²	0.1479				
R² ajustado	-0.4911				

(2) íon molecular: Coeficientes do Modelo

	b	error	t	p	significante
b0(X=1)	0.3019	0.2649	1.1396	0.3372	não
Voltagem (eV)(X1)	-0.0047	0.0044	-1.0705	0.3629	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	-0.0019	0.0012	-1.5719	0.214	não
X1*X2	3.73E-05	1.95E-05	1.9129	0.1517	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0.0143	3	0.0048	0.3658	0.7826
Resíduos	0.052	4	0.013		
Falta de ajuste	0.0475	1	0.0475	31.1978	0.0113
Erro puro	0.0046	3	0.0015		
Total	0.0663	7			
R²	0.2153				
R² ajustado	-0.3733				

Razão (2)/(1): Coeficientes do Modelo

	b	error	t	p	significante
b0(X=1)	0.061	0.1623	0.3761	0.7319	não
Voltagem (eV)(X1)	-6.49E-04	0.0027	-0.2429	0.8238	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	-2.47E-04	7.27E-04	-0.3403	0.7561	não
X1*X2	4.29E-06	1.19E-05	0.359	0.7434	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	9.50E-05	3	3.17E-05	0.0619	0.9773
Resíduos	0.002	4	5.12E-04		
Falta de ajuste	3.34E-04	1	3.34E-04	0.5855	0.4998
Erro puro	0.0017	3	5.71E-04		
Total	0.0021	7			
R²	0.0444				
R² ajustado	-0.6723				

Esteroides

(1) íon diagnóstico: Coeficientes do Modelo

	b	erro	t	p	significante
b0(X=1)	0.1562	0.1434	1.0897	0.3555	não
Voltagem (eV)(X1)	0.003	0.0024	1.2566	0.2978	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	-0.0011	6.42E-04	-1.6797	0.1916	não
X1*X2	2.00E-05	1.06E-05	1.8993	0.1537	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0.0217	3	0.0072	13.9534	0.0138
Resíduos	0.0021	4	5.18E-04		
Falta de ajuste	7.36E-04	1	7.36E-04	1.6505	0.2891
Erro puro	0.0013	3	4.46E-04		
Total	0.0238	7			
R²	0.9128				
R² ajustado	0.8474				

(2) íon molecular: Coeficientes do Modelo

	b	error	t	p	significante
b0(X=1)	-0.557	0.4145	-1.3439	0.2716	não
Voltagem (eV)(X1)	0.0098	0.0068	1.4371	0.2462	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	0.0017	0.0019	0.9277	0.422	não
X1*X2	-1.70E-05	3.05E-05	-0.5561	0.6169	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0.0374	3	0.0125	3.4216	0.1328
Resíduos	0.0146	4	0.0036		
Falta de ajuste	0.0034	1	0.0034	0.9138	0.4096
Erro puro	0.0112	3	0.0037		
Total	0.052	7			
R²	0.7196				
R² ajustado	0.5093				

Razão (2)/(1): Coeficientes do Modelo

	b	error	t	p	significante
b0(X=1)	-0.7093	0.3585	-1.9785	0.1423	não
Voltagem (eV)(X1)	0.0122	0.0059	2.065	0.1309	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	0.0034	0.0016	2.1095	0.1254	não
X1*X2	-4.38E-05	2.64E-05	-1.6587	0.1957	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0.0355	3	0.0118	4.1131	0.1027
Resíduos	0.0115	4	0.0029		
Falta de ajuste	0.0031	1	0.0031	1.1266	0.3664
Erro puro	0.0084	3	0.0028		
Total	0.047	7			
R²	0.7552				
R² ajustado	0.5716				

Esterenos

(1) íon diagnóstico: Coeficientes do Modelo

	b	erro	t	p	significante
b0(X=1)	0.5124	0.6599	0.7764	0.4941	não
Voltagem (eV)(X1)	-0.0057	0.0109	-0.5266	0.6349	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	-0.0043	0.003	-1.457	0.2412	não
X1*X2	6.95E-05	4.86E-05	1.4296	0.2482	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0.0468	3	0.0156	1.9026	0.2705
Resíduos	0.0328	4	0.0082		
Falta de ajuste	0.0044	1	0.0044	0.471	0.5418
Erro puro	0.0283	3	0.0094		
Total	0.0795	7			
R²	0.588				
R² ajustado	0.2789				

(2) íon molecular: Coeficientes do Modelo

	b	error	t	p	significante
b0(X=1)	-0.564	0.7059	-0.7991	0.4827	não
Voltagem (eV)(X1)	0.009	0.0116	0.7758	0.4944	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	0.002	0.0032	0.6374	0.5692	não
X1*X2	-2.01E-05	5.20E-05	-0.3859	0.7253	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0.038	3	0.0127	1.5079	0.3412
Resíduos	0.0336	4	0.0084		
Falta de ajuste	0.0012	1	0.0012	0.1084	0.7637
Erro puro	0.0324	3	0.0108		
Total	0.0715	7			
R²	0.5307				
R² ajustado	0.1788				

Razão (2)/(1): Coeficientes do Modelo

	b	error	t	p	significante
b0(X=1)	-1.0774	2.0408	-0.5279	0.6341	não
Voltagem (eV)(X1)	0.0208	0.0336	0.6195	0.5795	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	0.0105	0.0091	1.1466	0.3347	não
X1*X2	-1.54E-04	1.50E-04	-1.0255	0.3806	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0.1959	3	0.0653	0.9525	0.4957
Resíduos	0.2742	4	0.0685		
Falta de ajuste	0.0033	1	0.0033	0.0364	0.8609
Erro puro	0.2709	3	0.0903		
Total	0.47	7			
R²	0.4167				
R² ajustado	-0.0208				

Olefinas

(1) íon diagnóstico: Coeficientes do Modelo

	b	erro	t	p	significante
b0(X=1)	0.0082	0.5982	0.0137	0.9899	não
Voltagem (eV)(X1)	0.0035	0.0098	0.355	0.7461	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	-0.001	0.0027	-0.3884	0.7236	não
X1*X2	1.65E-05	4.40E-05	0.3741	0.7332	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0.0196	3	0.0065	0.6005	0.648
Resíduos	0.0436	4	0.0109		
Falta de ajuste	0.0203	1	0.0203	2.622	0.2038
Erro puro	0.0233	3	0.0078		
Total	0.0633	7			
R²	0.3105				
R² ajustado	-0.2066				

(2) íon molecular: Coeficientes do Modelo

	b	error	t	p	significante
b0(X=1)	-0.026	0.4102	-0.0633	0.9535	não
Voltagem (eV)(X1)	-5.78E-04	0.0068	-0.0856	0.9372	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	1.58E-04	0.0018	0.0861	0.9368	não
X1*X2	5.78E-06	3.02E-05	0.1915	0.8604	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0.0105	3	0.0035	1.1865	0.4204
Resíduos	0.0118	4	0.0029		
Falta de ajuste	8.25E-04	1	8.25E-04	0.2262	0.6669
Erro puro	0.0109	3	0.0036		
Total	0.0222	7			
R²	0.4709				
R² ajustado	0.074				

Razão (2)/(1): Coeficientes do Modelo

	b	error	t	p	significante
b0(X=1)	0.4975	1.8244	0.2727	0.8028	não
Voltagem (eV)(X1)	-0.0064	0.03	-0.2143	0.844	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	0.0012	0.0082	0.1515	0.8892	não
X1*X2	-1.77E-05	1.34E-04	-0.1316	0.9036	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0.0423	3	0.0141	0.2409	0.8641
Resíduos	0.2341	4	0.0585		
Falta de ajuste	0.0176	1	0.0176	0.2438	0.6554
Erro puro	0.2165	3	0.0722		
Total	0.2764	7			
R²	0.153				
R² ajustado	-0.4822				

n-Alcanos

(1) íon diagnóstico: Coeficientes do Modelo

	b	erro	t	p	significante
b0(X=1)	0.0546	0.6444	0.0847	0.9378	não
Voltagem (eV)(X1)	0.002	0.0106	0.19	0.8615	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	-4.48E-04	0.0029	-0.1553	0.8864	não
X1*X2	6.89E-06	4.74E-05	0.1452	0.8937	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0.0048	3	0.0016	0.1431	0.929
Resíduos	0.0451	4	0.0113		
Falta de ajuste	0.0181	1	0.0181	2.0136	0.251
Erro puro	0.027	3	0.009		
Total	0.05	7			
R²	0.0969				
R² ajustado	-0.5804				

(2) íon molecular: Coeficientes do Modelo

	b	error	t	p	significante
b0(X=1)	0.1792	0.2544	0.7043	0.532	não
Voltagem (eV)(X1)	-0.0024	0.0042	-0.5635	0.6125	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	-5.28E-04	0.0011	-0.4632	0.6748	não
X1*X2	9.98E-06	1.87E-05	0.5329	0.6311	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	6.54E-04	3	2.18E-04	0.161	0.9173
Resíduos	0.0054	4	0.0014		
Falta de ajuste	0.0012	1	0.0012	0.8589	0.4224
Erro puro	0.0042	3	0.0014		
Total	0.0061	7			
R²	0.1077				
R² ajustado	-0.5614				

Razão (2)/(1): Coeficientes do Modelo

	b	error	t	p	significante
b0(X=1)	0.5828	0.7035	0.8284	0.4682	não
Voltagem (eV)(X1)	-0.0078	0.0116	-0.6715	0.55	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	-0.0011	0.0032	-0.3342	0.7602	não
X1*X2	2.17E-05	5.18E-05	0.4193	0.7032	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0.0091	3	0.003	0.3293	0.8058
Resíduos	0.0369	4	0.0092		
Falta de ajuste	0.0047	1	0.0047	0.4358	0.5563
Erro puro	0.0322	3	0.0107		
Total	0.046	7			
R²	0.1981				
R² ajustado	-0.4034				

Álcoois

(1) íon diagnóstico: Coeficientes do Modelo

	b	erro	t	p	significante
b0(X=1)	-0.6009	0.5331	-1.127	0.3417	não
Voltagem (eV)(X1)	0.0123	0.0088	1.403	0.2552	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	9.22E-04	0.0024	0.3863	0.725	não
X1*X2	-1.84E-05	3.92E-05	-0.4699	0.6704	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0.0325	3	0.0108	2.1393	0.238
Resíduos	0.0202	4	0.0051		
Falta de ajuste	0.0018	1	0.0018	0.2843	0.6309
Erro puro	0.0185	3	0.0062		
Total	0.0527	7			
R²	0.616				
R² ajustado	0.3281				

(2) íon molecular: Coeficientes do Modelo

	b	error	t	p	significante
b0(X=1)	0.1019	0.1187	0.8582	0.4539	não
Voltagem (eV)(X1)	-0.0013	0.002	-0.6698	0.5509	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	-3.68E-04	5.32E-04	-0.6931	0.5381	não
X1*X2	6.82E-06	8.74E-06	0.78	0.4923	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	2.53E-04	3	8.43E-05	0.2492	0.8585
Resíduos	0.0014	4	3.38E-04		
Falta de ajuste	4.36E-04	1	4.36E-04	1.4274	0.318
Erro puro	9.17E-04	3	3.06E-04		
Total	0.0016	7			
R²	0.1575				
R² ajustado	-0.4744				

Razão (2)/(1): Coeficientes do Modelo

	b	error	t	p	significante
b0(X=1)	0.6442	0.8454	0.762	0.5015	não
Voltagem (eV)(X1)	-0.0098	0.0139	-0.7023	0.5331	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	-0.0014	0.0038	-0.3745	0.7329	não
X1*X2	2.65E-05	6.22E-05	0.4252	0.6993	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0.012	3	0.004	0.3431	0.7969
Resíduos	0.0466	4	0.0116		
Falta de ajuste	1.03E-04	1	1.03E-04	0.0066	0.9402
Erro puro	0.0465	3	0.0155		
Total	0.0586	7			
R²	0.2047				
R² ajustado	-0.3918				

Cetonas

(1) íon diagnóstico: Coeficientes do Modelo

	b	erro	t	p	significante
b0(X=1)	0.4138	0.9594	0.4313	0.6954	não
Voltagem (eV)(X1)	-0.0058	0.0158	-0.3686	0.7369	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	-0.0035	0.0043	-0.8254	0.4697	não
X1*X2	7.29E-05	7.06E-05	1.0327	0.3777	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0.0796	3	0.0265	0.9048	0.5133
Resíduos	0.1173	4	0.0293		
Falta de ajuste	0.0574	1	0.0574	2.8777	0.1884
Erro puro	0.0599	3	0.02		
Total	0.1969	7			
R²	0.4043				
R² ajustado	-0.0426				

(2) íon molecular: Coeficientes do Modelo

	b	error	t	p	significante
b0(X=1)	1.8497	2.1754	0.8503	0.4577	não
Voltagem (eV)(X1)	-0.028	0.0358	-0.7809	0.4918	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	-0.0095	0.0097	-0.9735	0.4021	não
X1*X2	1.67E-04	1.60E-04	1.0438	0.3733	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0.1357	3	0.0452	0.4396	0.7373
Resíduos	0.4117	4	0.1029		
Falta de ajuste	0.1039	1	0.1039	1.0126	0.3884
Erro puro	0.3078	3	0.1026		
Total	0.5474	7			
R²	0.2479				
R² ajustado	-0.3161				

Razão (2)/(1): Coeficientes do Modelo

	b	error	t	p	significante
b0(X=1)	1.0099	1.2026	0.8398	0.4627	não
Voltagem (eV)(X1)	-0.0144	0.0198	-0.7274	0.5196	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	-0.0044	0.0054	-0.8149	0.4748	não
X1*X2	7.37E-05	8.85E-05	0.8325	0.4662	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0.0218	3	0.0073	0.2022	0.89
Resíduos	0.1439	4	0.036		
Falta de ajuste	0.0498	1	0.0498	1.5896	0.2965
Erro puro	0.0941	3	0.0314		
Total	0.1657	7			
R²	0.1317				
R² ajustado	-0.5196				

Amostra (1 analito de cada classe)

(1) íon diagnóstico: Coeficientes do Modelo

	b	erro	t	p	significante
b0(X=1)	0.4453	0.2543	1.7512	0.1782	não
Voltagem (eV)(X1)	-0.0057	0.0042	-1.3651	0.2656	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	-0.0034	0.0011	-2.9481	0.0601	não
X1*X2	6.06E-05	1.87E-05	3.2396	0.0479	sim
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0.0343	3	0.0114	5.2478	0.0715
Resíduos	0.0087	4	0.0022		
Falta de ajuste	0.0045	1	0.0045	3.2256	0.1704
Erro puro	0.0042	3	0.0014		
Total	0.0431	7			
R²	0.7974				
R² ajustado	0.6455				

(2) íon molecular: Coeficientes do Modelo

	b	error	t	p	significante
b0(X=1)	0.1263	0.1186	1.0641	0.3654	não
Voltagem (eV)(X1)	-0.0018	0.002	-0.9116	0.4292	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	-0.001	5.31E-04	-1.9627	0.1445	não
X1*X2	1.82E-05	8.74E-06	2.0786	0.1292	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0.0028	3	9.25E-04	3.6943	0.1196
Resíduos	0.001	4	2.50E-04		
Falta de ajuste	8.61E-05	1	8.61E-05	0.2821	0.6321
Erro puro	9.16E-04	3	3.05E-04		
Total	0.0038	7			
R²	0.7348				
R² ajustado	0.5359				

Razão (2)/(1): Coeficientes do Modelo

	b	error	t	p	significante
b0(X=1)	0.1694	0.2342	0.7233	0.5218	não
Voltagem (eV)(X1)	-0.0019	0.0039	-0.4954	0.6543	não
Taxa de aquisição (espectros/s)(X2)	-0.001	0.001	-0.9826	0.3982	não
X1*X2	1.60E-05	1.72E-05	0.9295	0.4212	não
	SS	DF	MS	F	p
Regressão	0.0019	3	6.29E-04	0.6669	0.615
Resíduos	0.0038	4	9.44E-04		
Falta de ajuste	2.09E-04	1	2.09E-04	0.1755	0.7035
Erro puro	0.0036	3	0.0012		
Total	0.0057	7			
R²	0.3334				
R² ajustado	-0.1665				

ANEXO

Fonte: LAPPONI, 2005

Distribuição *t*

	Intervalo de Confiança					
Duas caudas	80%	90%	95%	98%	99,00%	99,90%
Uma cauda	90%	95%	98%	99%	99,50%	99,95%
	Nível de significância					
Duas caudas	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
Uma cauda	0,10	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0005
g.l. = 1	3,078	6,314	12,706	31,821	63,656	636,578
2	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,600
3	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924
4	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073

Fonte: LAPPONI, 2005

Distribuição F

Nível de significância: 0,05

Graus de liberdade: Numerador (colunas) e Denominador (linhas)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	20	25
1	161	199	216	225	230	234	237	239	241	242	243	244	246	248	249
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38	19,40	19,40	19,41	19,43	19,45	19,46
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,76	8,74	8,70	8,66	8,63
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,94	5,91	5,86	5,80	5,77
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,70	4,68	4,62	4,56	4,52
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	4,03	4,00	3,94	3,87	3,83
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,60	3,57	3,51	3,44	3,40
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	3,31	3,28	3,22	3,15	3,11
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	3,10	3,07	3,01	2,94	2,89
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,94	2,91	2,85	2,77	2,73
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,85	2,82	2,79	2,72	2,65	2,60
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75	2,72	2,69	2,62	2,54	2,50
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67	2,63	2,60	2,53	2,46	2,41
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65	2,60	2,57	2,53	2,46	2,39	2,34
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	2,51	2,48	2,40	2,33	2,28
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,49	2,46	2,42	2,35	2,28	2,23
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49	2,45	2,41	2,38	2,31	2,23	2,18
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	2,41	2,37	2,34	2,27	2,19	2,14
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42	2,38	2,34	2,31	2,23	2,16	2,11
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	2,31	2,28	2,20	2,12	2,07